



EXPOSIÇÃO E ACUMULAÇÃO DE ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS EM RÚCULA (*Eruca sativa*)

Andreia Filipa Brito Fidalgo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato

Coorientador: Mestre Joana Ride Sales

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: - Doutora Maria Luísa Louro Martins, Vice-Presidente do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

- Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

AGRADECIMENTOS

Queria expressar o meu sincero agradecimento a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta dissertação. Em particular:

Ao incansável Professor Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato, por toda a compreensão, atenção, disponibilidade e apoio ao longo de todo o trabalho.

À fantástica coorientadora e Mestre Joana Sales, pela amizade e por todo o conhecimento que me transmitiu e ensinou ao longo do trabalho, principalmente o tempo despendido e dedicação na revisão da dissertação. Também à Mestre Filipa Pinto pela amizade, dedicação e por tudo aquilo que me ensinou no laboratório.

Ao Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, principalmente à Unidade de Investigação em Química Ambiental (UIQA) pela facilitação de meios e condições necessárias para a realização deste trabalho.

À Mestre Inês Moreira e a todo o pessoal do laboratório pela boa disposição e por tornarem o ambiente mais divertido.

Ao senhor Felício pela ajuda durante o ensaio no Horto.

À minha melhor amiga Ana Montez pela amizade, carinho e por ter estado sempre presente nos bons e maus momentos ao longo de todo o meu percurso académico. Agradeço especialmente a ajuda incansável e apoio durante todo o trabalho laboratorial e escrito.

Aos meus amigos Diogo Cruz, Tiago Barroso e Raquel Falcato por todo o apoio, incentivo e pelos bons momentos que passamos juntos.

Ao meu namorado por todas as palavras de incentivo, boa disposição, amor, carinho e compreensão em todos os momentos.

Aos meus pais por me terem dado a oportunidade de ter acesso a um futuro melhor e por nunca deixarem que nada me faltasse. Agradeço sobretudo todo o carinho e apoio demonstrado ao longo do curso, pois sem eles nada disto seria possível.

À minha irmã, por ser tão importante, pela amizade, carinho e por todos os conselhos que forneceu ao longo da minha vida.

À minha avó por todo o amor, carinho e preocupação com o meu futuro.

A todos um muito Obrigada.

RESUMO

Neste trabalho foi avaliado o efeito da exposição de rúcula (*Eruca sativa*) a elementos potencialmente tóxicos (PTE) e ao efeito do NaCl, na acumulação e no desenvolvimento da planta. Foram analisados vários parâmetros de crescimento como a biomassa, o teor de matéria seca, o teor de clorofila (*Hansatech*) e composição mineral.

As amostras foram contaminadas com soluções contendo Cd, Cu, As e NaCl, durante 39 dias. A aplicação dos PTE e de NaCl não afetou significativamente a biomassa das plantas ao longo do tempo. O teor de matéria seca na presença de PTE e NaCl demonstrou uma tendência para o aumento ao longo do ensaio. Verificou-se uma diminuição significativa do teor de clorofila, que se manifestou pelo aparecimento de clorose, principalmente para as amostras contaminadas com Cd e Cu.

Foi verificada a acumulação de PTE na parte edível relativamente às amostras do controlo, obtendo-se valores de contaminação, após 41 dias, superiores aos limites estabelecidos por lei para produtos hortícolas de folha, sobretudo para o Cd e As. Quanto ao Cu, apesar de ser um elemento essencial aos organismos vivos, a sua concentração também excedeu os limites por lei após 41 dias de exposição, mas apenas para as amostras contaminadas com Cu.

Palavras-chave: Rúcula, *Eruca sativa*, cádmio, cobre, arsénio, salinidade.

ABSTRACT

In this project the effects of the exposure of rocket (*Eruca sativa*) to potentially toxic elements (PTE) was analysed. The effects of NaCl were also analysed, with particular interest in its accumulation and its effect in plant growth and development. Different growth parameters were studied such as biomass, dry matter and chlorophyll contents (*Hansatech*) and mineral composition.

The samples were exposed to solutions containing Cd, Cu, As and NaCl during 39 days. It was verified that the plants biomass did not change significantly with time when PTEs and NaCl were applied to them. The content of dry matter, however, showed an increasing trend throughout the experiments when exposed to the same components. Additionally, it was observed a significant decrease in the chlorophyll content, evidenced by the manifestation of chlorosis, mainly in the samples contaminated with Cu.

It was observed an accumulation of PTEs in the edible part of the control samples. After 41 days, the contamination levels were higher than the ones established by law for horticulture products, especially for Cd and As. Regarding the samples contaminated with Cu and taking into account that Cu is an essential element to all organisms, it was shown that its concentration also exceeded the limits permitted by law after 41 days of exposure.

Keywords: Rocket, *Eruca sativa*, cadmium, copper, arsenic, salinity.

EXTENDED ABSTRACT

During all their life, plants are exposed to conditions of oxidative stress and its origin can be biotic (caused by another organisms) or abiotic (caused by the exposure to potentially toxic elements, high salinity, temperature and other environmental factors). This will create disequilibrium between the production of reactive oxygen species (ROS) and the removal activity by the antioxidant system.

The production of ROS may damage some of the fundamental constituents through oxidative reactions, such as lipid peroxidation, changes in proteins and damages to DNA and RNA. ROS also affect the metabolic processes like breathing, photosynthesis, CO₂ fixation, etc.

One of the main problems concerning the industrial world is related to the soil contamination, sediments and water containing toxic chemical products. Heavy metals and metalloids are potentially toxic elements (PTE) that occur naturally in the soil. However, the majority of these elements are present in the soil due to the contamination resultant of anthropogenic activity.

The soil salinity is considered to be a serious problem in arid and semi-arid regions, where it limits the agricultural productivity and reduces the crop productivity.

In this project, irrigation experiments were conducted in order to evaluate the rocket's response to the stress induced by PTEs and NaCl.

In the irrigation experiments, that lasted for 59 days (including 39 days under the induced stress), Cd (50 µM), As (50 µM), Cu (100 µM) and NaCl (25 mM) were applied separately in order to study the rocket behaviour. For this study, the following parameters were analysed: biomass, dry matter content, chlorophyll (*Hansatech*) and mineral composition. In general, PTEs and NaCl did not negatively affect the plants biomass throughout the experiments. Furthermore, the NaCl experiment showed the lower quantity of biomass. Regarding the dry matter content, in the presence of PTE and NaCl this parameter exhibited an increasing trend throughout the experiments. It was also observed a significant decrease in the chlorophyll content, evidenced by the manifestation of chlorosis, mainly in the samples contaminated by Cu.

By evaluating the mineral composition, the absorbed Cd appears to stimulate the absorption of Ca, Mg, Mn and K while reducing the absorption of Cu, Fe, Na and Zn. In the experiments with Cu, this element appears to stimulate the absorption of Ca, Mg, Mn and K while reducing the absorption of Fe, Na and Zn. Regarding the experiments with As, it was observed that this element appears to stimulate the absorption of Ca, Mg, K and Na while reducing the absorption of Cu, Fe, Mn and Zn. In the experiments with NaCl, this element appears to stimulate the absorption of Zn and Fe while reducing the absorption of Ca, Cu, Mg, Mn and K. These results confirm, therefore, that PET and NaCl influence the nutrition value of the rocket plants.

The rocket plants showed visible changes in their growth and development when exposed to NaCl, where they revealed a deficient growth and smaller, darker green leaves. It was also observed an accumulation of Cd and As, where the contamination levels were higher than the ones established by law for horticulture products. Regarding the samples contaminated by Cu and taking into account that Cu is an essential element to all organisms, it was shown that its concentration also exceeded the limits permitted by law after 41 days of exposure.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
EXTENDED ABSTRACT	v
ÍNDICE	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE QUADROS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
1. OBJETIVOS	1
2. INTRODUÇÃO	2
2.1 Rúcula.....	2
2.2 Stresse oxidativo.....	4
2.3 Mecanismos de resposta ao stresse oxidativo.....	7
2.4 Elementos potencialmente tóxicos (PTE).....	8
2.4.1 Biodisponibilidade, bioacumulação e toxicidade	8
2.4.2 Metais pesados e a segurança alimentar	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Material Vegetal	18
3.2 Ensaio de crescimento	19
3.3 Determinações analíticas	21
3.3.1 Determinação do teor de matéria seca	21
3.3.2 Determinação da clorofila pelo método não destrutivo (<i>Hansatech</i>)	21
3.3.3 Determinação do conteúdo mineral	22
3.4 Tratamento estatístico	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Germinação das sementes.....	24
4.2 Efeito dos PTE e do NaCl	26
4.2.1 Biomassa.....	26
4.2.2 Teor de matéria seca.....	27

4.2.3 Quantificação da clorofila (<i>Hansatech</i>).....	29
4.3 Análise dos elementos minerais nas folhas.....	31
4.3.1 Arsénio	31
4.3.2 Cádmio	32
4.3.3 Cálcio	33
4.3.4 Cobre	35
4.3.5 Ferro	37
4.3.6 Magnésio	39
4.3.7 Manganês	40
4.3.8 Potássio.....	42
4.3.9 Sódio	43
4.3.10 Zinco	44
5. CONCLUSÃO	45
5.1 Propostas Futuras.....	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXO I - Ensaio de Crescimento nos dias de colheitas	liii
ANEXO II – Ensaio de Crescimento ao longo do tempo de exposição	liv

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração de Eruca sativa.....	3
Figura 2 - Equilíbrio na produção e remoção de ROS. A acumulação de ROS leva à formação excessiva destas espécies e o sistema antioxidante torna-se insuficiente.	5
Figura 3 - Mecanismo de formação das espécies reativas de oxigénio.	6
Figura 4 - Curvas dose/resposta de um elemento essencial (a) e não essencial (b) para as plantas.	9
Figura 5 – Reações de Fenton e Haber-Weiss.	14
Figura 6 - Sementes de rúcula.	18
Figura 7 – Preparação das turfas para a germinação de sementes de rúcula.	19
Figura 8 – Germinação de sementes rúcula.	19
Figura 9 - Determinação não destrutiva de clorofila com Hansatech.	21
Figura 10 - Carrocel de amostras no interior do micro-ondas (CEM MDS 2000).	22
Figura 11 - Germinação de sementes de rúcula em turfas.	24
Figura 12 - Ensaio de crescimento com plantas de rúcula nos dias de colheita.	25
Figura 13 - Variação média da biomassa total (g) de plantas controlo (C) e expostas a stresse com 50 μM de Cd, 100 μM de Cu, 50 μM de As e 25 mM de NaCl, durante 39 dias de contaminação.	26
Figura 14 - Teor de matéria seca (%) de folhas de rúcula de plantas controlo e contaminadas com 50 μM de Cd, 100 μM de Cu, 50 μM de As e 25 mM de NaCl durante 39 dias de contaminação.	27
Figura 15 - Teor médio de clorofila (Unidades Hansatech), para o ensaio de plantas controlo e contaminadas com 50 μM de Cd, 100 μM de Cu, 50 μM de As e 25 mM de NaCl durante 39 dias de contaminação.	29
Figura 16 - Sintoma visível do efeito tóxico dos contaminantes Cd (A) e Cu (B).	30
Figura 17 – Ausência de sintomas visíveis do efeito tóxico do contaminante As.	30
Figura 18 – Sintoma visível do efeito tóxico do contaminante NaCl.	30

Figura 19 - Teor de As (mg kg^{-1} matéria seca) em folhas de plantas de rúcula, durante 39 dias de contaminação.	31
Figura 20 - Teor de Cd (mg kg^{-1} matéria seca) em folhas de plantas de rúcula, durante 39 dias de contaminação.	32
Figura 21 - Teor de Ca (mg kg^{-1} matéria seca) em folhas de plantas de rúcula, durante 39 dias de contaminação.	33
Figura 22 - Teor de Cu (mg kg^{-1} matéria seca) em folhas de plantas de rúcula, durante 39 dias de contaminação.	35
Figura 23 - Efeito tóxico da exposição prolongada ao Cu.	35
Figura 24 - Teor de Fe (mg kg^{-1} matéria seca) em folhas de plantas de rúcula, durante 39 dias de contaminação.	37
Figura 25 - Teor de Mg (mg kg^{-1} matéria seca) em folhas de plantas de rúcula, durante 39 dias de contaminação.	39
Figura 26 - Teor de Mn (mg kg^{-1} matéria seca) em folhas de plantas de rúcula, durante 39 dias de contaminação.	40
Figura 27 - Teor de K (mg kg^{-1} matéria seca) em folhas de plantas de rúcula, durante 39 dias de contaminação.	42
Figura 28 - Teor de Na (mg kg^{-1} matéria seca) em folhas de plantas de rúcula, durante 39 dias de contaminação.	43
Figura 29 - Teor de Zn (mg kg^{-1} matéria seca) em folhas de plantas de rúcula, durante 39 dias de contaminação.	44

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 - Preparação de garrafões de 5L com as soluções stock dos contaminantes e NaCl analisados mais solução nutritiva HOAGLAND.	20
Quadro 2 - Composição da Solução Nutritiva de HOAGLAND.....	20

LISTA DE ABREVIATURAS

APX – Ascorbato-peroxidase

ASC – Ascorbato

ATP – Adenosinatrifosfato

CAT – Catalase

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EAA - Espectrofotometria de absorção atômica

GPX – Glutathiona-peroxidase

GR – Glutathiona redutase

GSH – Glutathiona

HACCP – Hazard Analysis and Critical Control Point

MDA - Malondialdeído

NADPH – Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato

POD – Guaiacol-peroxidase

PPO – Polifenoloxidase

PSI – Fotossistema I

PSII – Fotossistema II

PTE – Elementos potencialmente tóxicos (*Potentially Toxic Elements*)

ROS – Espécies reativas de oxigénio (*Reactive oxygen species*)

RNA – Ácido ribonucleico

SOD – Superóxido-dismutase

1. OBJETIVOS

A contaminação de produtos hortícolas com metais pesados, tóxicos para o Homem, surge principalmente devido à contaminação de solos ou de água de rega, como resultado das atividades humanas (agrícola, industrial e mineira). Estes metais podem estar presentes em pesticidas, fertilizantes ou resíduos de várias origens, tornando-se numa preocupação crescente pois começa a tomar dimensões difíceis de controlar, sugerindo um problema não só de saúde humana mas também a nível económico.

Desta forma torna-se importante compreender o efeito que os metais pesados, metaloides e até mesmo a elevada salinidade, têm na produtividade das plantas e averiguar se a exposição a meios contaminados pode resultar na acumulação da parte edível, que alterações induzem nas plantas e consequentemente que riscos podem trazer para o Homem quando utilizadas na alimentação.

O efeito tóxico de grande parte dos contaminantes químicos nas plantas manifesta-se por stresse oxidativo, uma forma de stresse abiótico (causado por um fator externo que não um ser vivo), que resulta de um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e a atividade de remoção pelo sistema de defesa antioxidante naturalmente existente nos seres vivos.

De entre os produtos hortícolas, a rúcula tem-se destacado entre as hortícolas pela sua composição nutricional, com elevados teores de cálcio, ferro, potássio, enxofre e vitaminas A e C e pelo sabor pungente e odor agradável (Steiner, 2010; Rodrigues *et al.*, 2008; Vasconcelos *et al.*, 2011). As suas folhas são habitualmente consumidas cruas em saladas, o que torna ainda mais preocupante o risco de contaminação.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de alguns elementos potencialmente tóxicos, como Cd, Cu, As e de salinidade, na forma de cloreto de sódio, no desenvolvimento da rúcula e a acumulação verificada nas suas folhas. Para isso foram analisados os efeitos da toxicidade destes elementos através de diversos parâmetros: biomassa, teor de matéria seca, teor de clorofila (*Hansatech*) e composição mineral.

2. INTRODUÇÃO

2.1 Rúcula

A rúcula (*Eruca sativa*) é uma espécie que pertence à família *Brassicaceae*, também designada por *Cruciferae*, inclui geralmente plantas herbáceas ou pequenos arbustos, que se distribuem por cerca de 419 espécies e mais de quatro mil géneros. O seu consumo é relativamente elevado, por comparação com outras culturas hortícolas e variável dependendo da região geográfica (Almeida, 2006).

As Brassicáceas são espécies presentes em vários locais do mundo, encontrando-se, no entanto, em maior diversidade na região do Mediterrâneo, sudoeste da Ásia, Ásia Central e costa ocidental da América do Norte. Estas espécies de grande importância económica estão entre as principais culturas hortícolas a nível mundial, a avaliar pela área, volume de produção e pelo consumo. A maioria das brássicas são cultivadas para o aproveitamento das folhas, embora algumas espécies forneçam raízes comestíveis e outras sejam aproveitadas pelas suas sementes (Almeida, 2006).

A rúcula é uma planta herbácea anual, do género *Eruca*. É originária do Sul da Europa e do Próximo Oriente, sendo conhecida e utilizada desde a Antiguidade pelos romanos como condimento e como planta medicinal (Almeida, 2006).

Morfológicamente apresenta porte baixo, folhas relativamente espessas (Almeida *et al.*, 2011) dispostas em roseta e profundamente lobadas. A corola é branca ou com tonalidade amarelada e as síliquas são eretas (Almeida, 2006) (Figura 1).

Quanto à produtividade, é uma cultura de rápido crescimento vegetativo e ciclo curto (Steiner, 2010). Apesar de a sementeira ser recomendada o ano todo, o seu desenvolvimento normal é favorecido por condições de temperaturas amenas, entre 15 a 18 °C (Vasconcelos *et al.*, 2011). Com temperaturas mais altas, a planta antecipa a fase reprodutiva, emitindo prematuramente ramificações florais que prejudicam a produção, pelo que as folhas tornam-se menores e mais rijas (Bothmann & Simonetti, 2011; Rodrigues *et al.*, 2008). Sendo assim o espigamento ocorre em condições de temperatura elevada e dias longos, o que pode ser um problema em regiões de latitudes elevadas (acima dos 40 °N) e com temperaturas altas (30 °C) (Almeida, 2006).

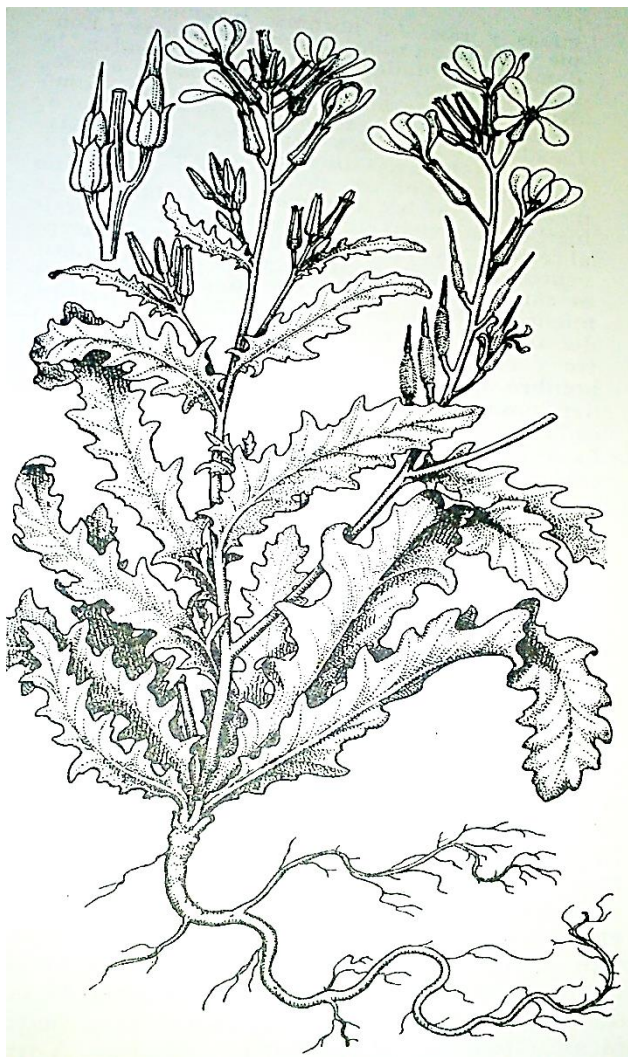


Figura 1 - Ilustração de *Eruca sativa*.

(*Plantas Medicinales*, 1988)

Na culinária o uso de rúcula é um pouco restrito devido ao sabor forte das suas folhas, no entanto são normalmente utilizadas em saladas, podendo ser combinadas com outras hortaliças para suavizar o gosto picante (Almeida, 2006). Quanto à composição nutricional, tem-se destacado entre as hortaliças, devido a elevados teores de cálcio, ferro, potássio, enxofre e vitaminas A e C, teores em ácidos gordos ómega 3 e pelo sabor pungente e odor agradável (Steiner, 2010; Rodrigues *et al.*, 2008; Vasconcelos *et al.*, 2011). Além disso, sendo plantas da família das brássicas possuem glucosinolatos e metabolitos secundários atualmente associados a efeitos benéficos na saúde dos consumidores (Almeida, 2006).

2.2 Stresse oxidativo

As plantas estão expostas a condições ambientais que podem levar a alterações no seu metabolismo e desenvolvimento. Ao conjunto de alterações fisiológicas, que resultam da produção intracelular excessiva e/ou acumulação de espécies reativas de oxigénio (ROS) e que afetam processos metabólicos tais como a respiração, fotossíntese, fixação de CO₂, entre outros, é designada por stresse oxidativo (Vangrosveld & Clijsters, 1994).

O stresse oxidativo pode ser biótico, causado por outros organismos, ou abiótico, resultante de um excesso ou um défice no ambiente físico ou químico como seca, radiação ultravioleta, excesso de água ou luz, carência de nutrientes, exposição a elementos potencialmente tóxicos, elevada salinidade, entre outros (Apel & Hirt, 2004). Este fenómeno ocorre quando existe um sério desequilíbrio entre a produção de ROS e o sistema de defesa antioxidante (Ahmad *et al.*, 2008). O desequilíbrio desencadeia na planta uma resposta metabólica que se traduz na ativação de determinados mecanismos específicos de eliminação de ROS no interior das células, de forma a controlar a sua acumulação e permitir a regulação da expressão genética (Martins & Mourato, 2008).

Uma vez que o stresse oxidativo leva à produção descontrolada de ROS, extremamente tóxicas aos vegetais (Rossi, 2012), a manutenção do equilíbrio entre a sua produção e as defesas antioxidantes é uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo (Ferreira & Abreu, 2007). Caso este equilíbrio não seja conseguido, começam a manifestar-se os efeitos tóxicos resultantes do excesso de ROS nas células e que se traduz normalmente por alterações de natureza oxidativa nos componentes celulares.

As espécies reativas de oxigénio, ou ROS, tais como superóxido (O₂^{•-}), peróxido de hidrogénio (H₂O₂), radicais hidroxilo (HO[•]) e singleto de oxigénio (¹O₂), formam-se regularmente nas células como subprodutos do metabolismo aeróbio das plantas. Estes resultam de diferentes vias metabólicas, como respiração celular, fotorrespiração, oxidação de lípidos e fotossíntese, localizadas em diversos compartimentos celulares, nomeadamente mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomas (Navrot *et al.*, 2007; Apel & Hirt, 2004; Möller *et al.*, 2007).

Durante o stresse, a produção de ROS ocorre principalmente nos organelos com elevada atividade de oxidação metabólica ou com estimulação para o fluxo de eletrões, tais como os cloroplastos e mitocôndrias. Em relação aos cloroplastos, a formação de ROS está relacionada com a fotossíntese. A ocorrência de fotorrespiração nos peroxissomas é outra forma de produção de H₂O₂ (Soares & Machado, 2007).

Segundo condições fisiológicas normais, existe um equilíbrio entre a produção de ROS e a sua eliminação (Figura 2), ou seja, grande parte das ROS são produzidas em baixas quantidades, posteriormente retidas e/ou acumuladas em certos compartimentos celulares, onde a sua formação e eliminação é estritamente controlada (Apel & Hirt, 2004).

Quando as plantas estão sujeitas a condições desfavoráveis, este equilíbrio é alterado, conduzindo a um aumento rápido do nível intracelular das ROS (Mittler, 2002).

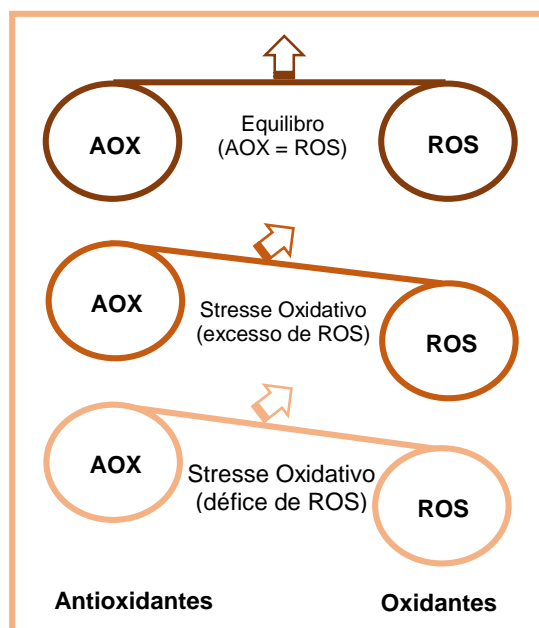


Figura 2 - Equilíbrio na produção e remoção de ROS. A acumulação de ROS leva à formação excessiva destas espécies e o sistema antioxidante torna-se insuficiente.

(Adaptado de Scandalios *et al.*, 2005)

As plantas, sendo organismos aeróbios, usam o oxigénio molecular (O_2) como aceitador final de eletrões, resultando na redução de O_2 e consequentemente a produção ROS (Halliwell, 2006).

No caso da mitocôndria, a fosforilação oxidativa e a síntese de ATP, processo que leva ao transporte de eletrões através da cadeia transportadora eletrónica, permite que os eletrões sejam transferidos por complexos proteicos com potencial redutor crescente (reações oxidação-redução), sendo o oxigénio (O_2) o último aceitador de eletrões. No entanto, parte do oxigénio é reduzido de forma incompleta pelos complexos I e III, resultando o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Admite-se que o consumo de oxigénio na mitocôndria para a produção de ROS é de 1-5%. Nos cloroplastos, ocorre a produção de singleto de oxigénio (1O_2) no fotossistema II (PSII) e do $O_2^{\cdot-}$ no fotossistema I (PSI) e PSII. Os peroxissomas produzem $O_2^{\cdot-}$ e peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em diversas reações metabólicas (Möller *et al.*, 2007).

O mecanismo de formação de ROS caracteriza-se por reações em série a partir do oxigénio no estado estacionário. Estas podem ser originadas por inversão do spin de um eletrão (1O_2) ou por transferência de 1, 2 ou 3 eletrões, dando origem ao $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e o radical hidroxilo (HO^{\cdot}) (Figura 3).

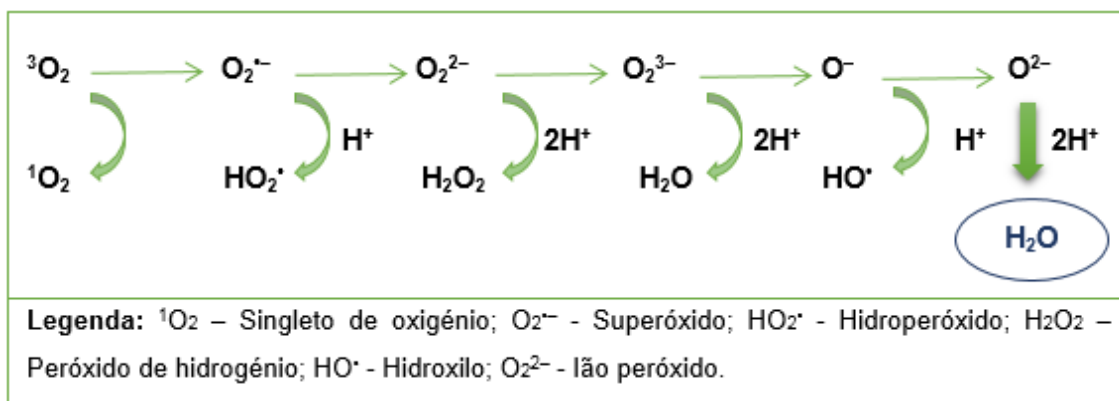


Figura 3 - Mecanismo de formação das espécies reativas de oxigênio.

(Adaptado de Apel & Hirt, 2004)

Os danos causados pelas ROS dependem de vários fatores, como a quantidade produzida de cada espécie, a reatividade e as moléculas em que atuam, o tempo semivida, a distância percorrida na célula e o compartimento celular onde são produzidas em grande quantidade. O H_2O_2 e o $\text{O}_2^{\bullet-}$ são espécies com reduzida reatividade que se formam em condições metabólicas estáveis, no entanto, o HO^{\bullet} e $^1\text{O}_2$ são espécies muito mais reativas e perigosas, formando-se simplesmente em condições de stresse. No caso do HO^{\bullet} , este é especialmente difícil de degradar, pois não são conhecidos os mecanismos específicos que o consigam eliminar. Sendo assim, é melhor para a célula eliminar os seus precursores, como o superóxido, $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Möller *et al.*, 2007).

A produção de ROS pode danificar alguns constituintes fundamentais a partir de reações oxidativas, tais como reações de peroxidação de lípidos membranares insaturados (PUFA), que originam a destabilização das membranas, a perda da compartimentação celular e o aumento da permeabilidade a iões e solutos (Pinto *et al.*, 2009; Cuypers *et al.*, 2010; Möller *et al.*, 2007). As ROS também podem desencadear alterações nas proteínas, provocando inibição enzimática e danos ao nível do DNA e RNA. Isto pode ter implicações negativas nas células, como a perda das funções de certos organelos, causar danos nas membranas, redução da eficiência metabólica, redução da fixação de carbono e mutações. A senescência, diminuição do processo de fotossíntese e necrose das folhas são exemplos destas implicações negativas (Scandalios, 2002; Möller *et al.*, 2007).

No limite, estas reações podem originar a morte celular, pelo que o controlo do nível de ROS em cada compartimento é essencial para prevenir a sua toxicidade (Mittler, 2002; Apel & Hirt, 2004).

2.3 Mecanismos de resposta ao stresse oxidativo

Com o aumento da produção intracelular de ROS, surgem alterações metabólicas que se destinam a evitar os efeitos oxidativos desencadeados por estas espécies, e que constituem mecanismos antioxidantes de defesa, que podem ser de natureza enzimática e não enzimática (Mittler, 2002).

Os mecanismos enzimáticos são as principais vias de remoção de ROS nas plantas, envolvem enzimas que atuam de forma direta na remoção de ROS ou que catalisam reações de formação e regeneração de moléculas para a retenção das espécies reativas de oxigénio. São exemplos destas enzimas antioxidantes, a superóxido-dismutase (SOD), a catalase (CAT), as peroxidases como a guaiacol-peroxidase (GPOD), a glutatona-peroxidase (GPX) e a ascorbato-peroxidase (APX) (Martins & Mourato, 2008; Mittler, 2002; Scandalios, 1993; Smeets *et al.*, 2007). Nas plantas, o maior sistema antioxidante envolve a ação da SOD, APX e CAT. Estas enzimas são cruciais na diminuição do impacto do stresse oxidativo nas células (Apel & Hirt, 2004).

Relativamente aos mecanismos não enzimáticos, destacam-se a glutatona (GSH) e o ácido ascórbico (ASC), assim como, embora com pouca evidência, os flavonoides, tocoferol, alcalóides e carotenóides. A glutatona (GSH) quando é oxidada pelas ROS forma a glutatona oxidada (GSSG), enquanto o ascorbato é oxidado na forma monodesidroascorbato e desidroascorbato, sendo regenerados (GSH e ASC) pelo ciclo glutatona-ascorbato (Apel & Hirt, 2004).

Todos os mecanismos de defesa desencadeados pelas plantas são considerados como estratégias internas de resposta ao stresse oxidativo. Porém existem mecanismos que atuam no controlo da captação de metais pelas plantas, ou seja, atuam na restrição da absorção e do transporte do metal para dentro da planta, sendo designados por mecanismos externos.

Estes mecanismos externos promovem o aumento da produção e excreção de agentes de retenção e acidificação da rizosfera, exclusão dos metais por absorção seletiva e reserva dos metais nas raízes, evitando a sua translocação para a parte aérea. Normalmente os teores de metais na raiz são mais elevados que na parte aérea, pelo facto da maior parte dos metais ficar retido no apoplasto e nas paredes celulares das raízes, em pectinas e em grupos com carga negativa de proteínas (Martins & Mourato, 2008).

2.4 Elementos potencialmente tóxicos (PTE)

Dentro da denominação de PTE estão incluídos os metais pesados e metaloides como o arsénio. A definição de metal pesado é bastante variável, baseando-se em diversos parâmetros, como a densidade dos elementos, a massa atômica, o número atômico e a toxicidade (Duffus, 2002). Alguns autores consideram que os metais pesados são elementos com densidade superior a 5 g/cm³ (di Toppi & Gabbrielli, 1999).

Existem metais pesados que são nutrientes essenciais para as plantas, tal como o cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), molibdénio (Mo), zinco (Zn), níquel (Ni) e boro (B), e outros são não essenciais e aparecem na natureza como poluentes (tóxicos), como é o caso do cádmio (Cd), mercúrio (Hg) e chumbo (Pb) (Mourato *et al.*, 2012).

Os metais pesados ocorrem naturalmente, como constituintes de rochas, havendo um fundo geoquímico destes no solo, na água e nos seres vivos. Sendo assim, entende-se que a poluição só ocorre quando a concentração destes elementos num dado meio é bastante superior aos níveis básicos já existentes (Gonçalves, 2000). Contudo, a grande maioria dos metais pesados aparecem nos solos por contaminação resultante da atividade antropogénica (agrícola, industrial e mineira). Estes metais podem estar presentes em pesticidas, fertilizantes ou resíduos de diversas origens (Reichman, 2002).

Muitos contaminantes podem permanecer no ambiente durante um longo período de tempo, acumulando-se a níveis considerados prejudiciais para o ser humano. Um dos grandes problemas que o mundo industrializado enfrenta está relacionado com a contaminação dos solos, sedimentos e água com químicos tóxicos (Gratão *et al.*, 2005).

A presença destes poluentes no solo constitui um grave risco ecológico, causando a deterioração da qualidade do ar, do ambiente, das águas subterrâneas e superficiais, entrando por fim na cadeia alimentar. Quanto à toxicidade dos metais pesados, esta vai depender de uma série de fatores, como a natureza do metal, a forma tóxica existente, a biodisponibilidade, a solubilidade, a mobilidade na planta, a taxa de acumulação nos seres vivos, o local de acumulação e a posição do organismo na cadeia alimentar (Martins & Mourato, 2008).

2.4.1 Biodisponibilidade, bioacumulação e toxicidade

A designação de metais pesados abrange tanto os micronutrientes essenciais, indispensáveis para o desenvolvimento normal da planta, e os metais pesados não essenciais, que podem encontrar-se presentes nestes seres vivos sem qualquer função específica ou conhecida (Martins & Mourato, 2008).

Quando os elementos essenciais atingem uma determinada concentração, isto é, ultrapassam o limite de segurança, podem causar problemas de toxicidade. Abaixo das concentrações adequadas causam um déficit de crescimento e podem influenciar negativamente o metabolismo dos organismos vivos. Relativamente aos elementos não essenciais, estes não causam desordens por deficiência como os micronutrientes, no entanto, acima de determinados limites de concentração, concentrações que ultrapassam a tolerância dos organismos, causam problemas de toxicidade como está presente na Figura 4.

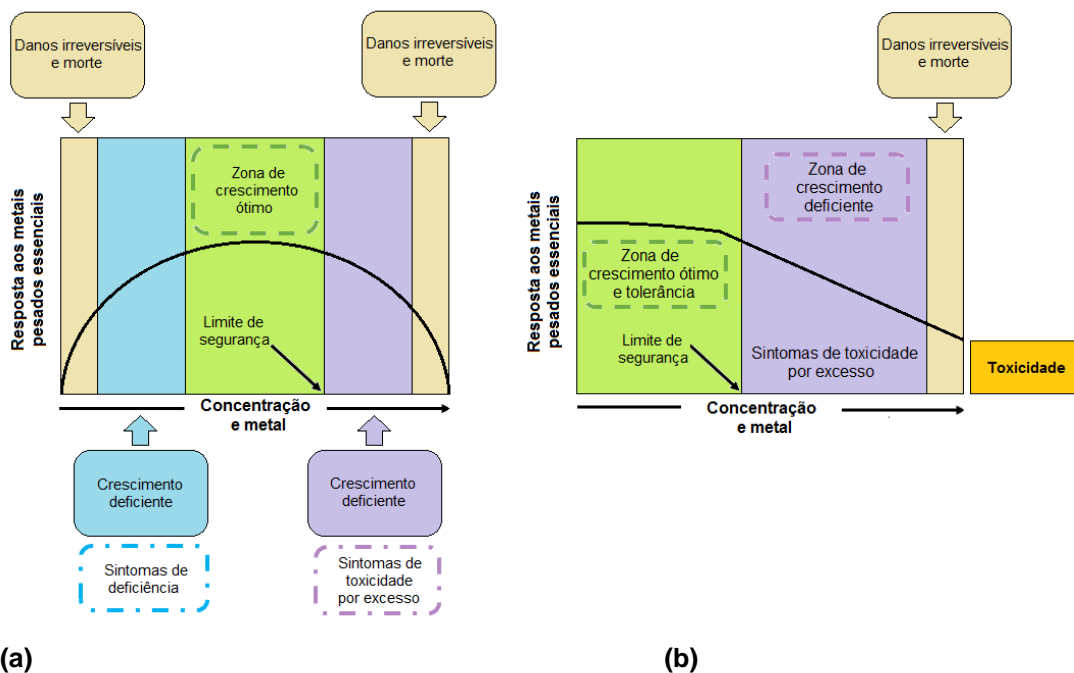


Figura 4 - Curvas dose/resposta de um elemento essencial (a) e não essencial (b) para as plantas.

(Adaptado de Prasad, 2004)

A toxicidade de um metal pesado depende, entre outros fatores, da sua biodisponibilidade, ou seja, da presença de formas capazes de serem utilizadas por plantas ou organismos do solo (Varenes, 2003). Sendo assim, a fração biodisponível de um metal pesado para as plantas é definida como a fração do metal total presente no solo que pode ser absorvida por estes seres vivos (Reichman, 2002). Apesar dos metais existirem em diferentes formas químicas, tais como, formas precipitadas, adsorvidas ou existentes na matriz dos minerais do solo, a única diretamente disponível para a absorção das plantas é a forma solúvel na solução do solo (Martins & Mourato, 2008).

A biodisponibilidade dos metais pesados vai depender de várias características do solo, como o pH, o teor de matéria orgânica e de argila, a capacidade de troca catiónica, a força iónica, o potencial redox, a textura e a flora microbiana (Martins & Mourato, 2008).

Considerando a biodisponibilidade dos metais pesados, as plantas são divididas em três grupos (Silva, 2006; Martins & Mourato, 2008):

- Acumuladoras ou Hiperacumuladoras: acumulam metais pesados de solos com níveis altos ou baixos;
- Indicadoras: a concentração no tecido vegetal reflete a concentração do solo, havendo uma relação linear entre as duas;
- Exclutoras: apresentam mecanismos específicos para regular a biodisponibilidade dos metais, por interferirem neste equilíbrio, através de mecanismos externos que atuam na restrição da absorção do metal a partir do solo.

A toxicidade é considerado um parâmetro complexo, pois depende da capacidade de determinada espécie recetora provocar efeitos nocivos aos organismos com os quais entra em contato (Pinto, 2011). Um elemento pode ser fitotóxico para algumas plantas e não apresentar toxicidade significativa para o Homem e vice-versa, acumulando-se na planta (no caso de não ter função biológica) e consequentemente propaga-se na cadeia trófica induzindo efeitos tóxicos nos seres vivos (Silva, 2006). Os metais tóxicos apenas causam fitotoxicidade quando estão biodisponíveis em níveis elevados (Pinto, 2011). Os efeitos visuais da fitotoxicidade dos metais pesados nas plantas, correspondem a uma redução do crescimento radicular e da parte aérea e a um crescimento atrofiado da planta, sintomas foliares específicos que resultam do efeito tóxico do metal (Martins & Mourato, 2008). Por exemplo, o cádmio (Cd), um dos metais mais perigosos, apresenta um elevado potencial de bioacumulação devido à sua semelhança com elementos zinco, cálcio, magnésio e potássio (Pinto, 2011). A forma de evitar o excesso de cádmio nos solos (derivado das atividades antropogénicas), pode passar pelo uso de plantas que acumulam este tipo de metal do solo ou dos lençóis freáticos (Sharma & Dietz, 2008).

O conceito de fitorremediação tornou-se importante na acumulação de metais pela planta. A utilização da acumulação como meio de remoção de metais contaminantes do solo e da água tem sido sugerida com base em observações bem documentadas de diversas espécies de plantas, que além de tolerarem níveis tóxicos de metais no solo, também os acumulam na sua parte aérea (Clemens *et al.*, 2002).

2.4.2 Metais pesados e a segurança alimentar

Embora os metais pesados sejam constituintes naturais da crosta terrestre, e alguns deles sejam até elementos essenciais, são geralmente tóxicos em concentrações elevadas e como tendem a acumular-se nos organismos vivos ao longo do tempo, constituem um risco para a saúde humana. O cádmio é um dos metais pesados que apresentam maiores riscos para a segurança dos alimentos (Veiga *et al.*, 2009).

Estes perigos de natureza química podem alcançar o organismo humano, sendo uma das vias de exposição mais importantes a via alimentar. No ambiente, os contaminantes podem ser absorvidos por plantas ou animais da base da cadeia alimentar, sendo depois consumidos por animais dos níveis superiores da cadeia. Sendo assim, os alimentos fazem parte do ambiente global suscetível de ser contaminado por agentes químicos de diferentes origens ou fontes (Veiga *et al.*, 2009)

Segundo a FIPA (Federação das Indústrias Portuguesas Agroalimentares) a Segurança Alimentar surge atualmente como uma das principais preocupações da Indústria Alimentar. Tal decorre da grande preocupação do consumidor com os alimentos que ingere e do receio que estes não sejam seguros para a saúde humana (Agroportal, 2002).

Todos os intervenientes numa cadeia alimentar têm a responsabilidade de garantir a segurança dos produtos alimentares nas fases em que intervêm, independentemente da natureza das atividades que desenvolvem. Como tal, os sistemas de segurança alimentar devem ser desenhados por forma a controlar o processo de produção e basear-se em princípios e conceitos preventivos. Estes sistemas aplicam medidas que garantem um controlo eficiente, através da identificação de pontos ou etapas onde se pode controlar os perigos para a saúde dos consumidores, sendo atualmente a metodologia HACCP (*Hazards Analysis and Critical Control Points*), o ponto de referência internacionalmente aceite para implementação de sistemas de segurança alimentar (Baptista *et al.*, 2003).

2.4.2.1 Cádmio

O cádmio (Cd) é um dos principais contaminantes ambientais e um dos mais tóxicos entre os metais pesados (Chen & Kao, 1995), apresentando uma densidade de 8,6 g cm⁻³ (di Toppi & Gabbrielli, 1999). Este elemento é pouco frequente na crosta terrestre, encontrando-se sob a forma vestigial na maioria dos solos e uniformemente distribuído nas rochas mais abundantes da crosta terrestre (Mendes & Oliveira, 2004).

As contaminações de Cd nos solos são particularmente importantes, pois este metal é captado eficientemente pelas plantas, entrando na cadeia alimentar do Homem e outros seres vivos (ATSDR, 1999).

Apesar de o cádmio ser relativamente móvel no solo sob a forma de íão Cd^{2+} , compete com os íões de Ca^{2+} e K^+ à superfície de coloides de argila e coloides orgânicos, pelo que a disponibilidade de alguns nutrientes interfere na biodisponibilidade e absorção de Cd (Pinto, 2011).

A mobilidade do Cd no solo é reduzida quando ocorre um aumento do pH, da quantidade de coloides capazes de o adsorver e do teor de matéria orgânica (Lamas, 2012). A sua disponibilidade é baixa em solos alagados, devido à formação de sulfureto de cádmio (CdS), mas em solos ácidos e solos salinos ocorre a formação de complexos solúveis, como é o caso do íão cloreto (como CdCl^+), pelo que as plantas absorvem mais Cd (Varenes, 2003). Sendo assim, o pH é um fator determinante para a disponibilidade do metal em solos e sedimentos, ou seja, quanto maior a acidez maior a disponibilidade (Smolders & Mertens, 2013).

As principais fontes de poluição com cádmio estão associadas à combustão de carvão, às metalurgias de zinco, cobre e ferro, aos tratamentos de superfície e à agricultura. Além disso, encontram-se situações de poluição urbana devidas ao tráfego automóvel, fabrico de ligas, soldas e baterias, uso como estabilizante de materiais plásticos, pigmento (CdS , CdSe), entre outros. (Mendes & Oliveira, 2004). Como o cádmio não é degradado, o risco de exposição ambiental está constantemente a aumentar devido à acumulação na cadeia alimentar (Moreira, 2011). De acordo com Gomes (1998), pelo menos 70 % do Cd ingerido pelo Homem é derivado de alimentos vegetais, pelo que estes tornam-se indicadores das concentrações dos contaminantes do meio ambiente. As plantas, ao contrário dos animais e do Homem, conseguem tolerar níveis mais elevados deste metal (Mengel & Kirkby, 2001).

A acumulação de Cd interfere na assimilação, transporte e utilização de diversos elementos como Ca, Mg, P e K, bem como de água (di Toppi & Gabbrielli, 1999). A absorção de íões Cd parece estar em competição para o mesmo transportador transmembranar com nutrientes, tais como K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, Ni (Benavides *et al.*, 2005). A substituição do Ca e Mg nos tecidos pelo Cd, sob a forma iónica, deve-se à semelhança dos respetivos raios atômicos (Pinto, 2011). O Cd e o Zn são quimicamente muito semelhantes, sendo o Cd capaz de imitar o comportamento do Zn nas suas funções de absorção e funções metabólicas (Mengel & Kirkby, 2001). Deste modo a deficiência destes íões ocasiona uma maior absorção de cádmio pelas plantas (Gomes, 1998).

A absorção do Cd pelas plantas pode ocorrer a nível radicular e foliar e como é muito móvel torna-se perigoso, pois ao ser absorvido pelas raízes é facilmente transferido para outras partes da planta, afetando os seus processos metabólicos ou acumulando-se nos tecidos. No que diz respeito à absorção foliar, esta ocorre a partir do cádmio presente na atmosfera, no entanto depende de vários fatores, tais como as emissões industriais e urbanas, a superfície foliar, a precipitação da zona e a velocidade do vento (Pinto, 2011).

Quando absorvido pelas plantas, o Cd torna-se fitotóxico e pode trazer consequências negativas sobre diversos processos celulares, conduzindo a uma redução do crescimento das

plantas, diminuição do teor de clorofila (cloroses das folhas) e aumento da senescência foliar. A manifestação destes sintomas resulta de mudanças nos componentes bioquímicos da planta e vias metabólicas, como deficiente na absorção de nutrientes, distúrbios na absorção de água e relações de água, diminuição na taxa fotossintética, indução da peroxidação lipídica e quebra de clorofila, e inibição de muitas enzimas (Martins *et al.*, 2011).

Segundo o *Codex Alimentarius* o limite semanal para a ingestão de cádmio recomendado é $7 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal, já a dose letal média (DL_{50}) para o Homem é de $0,027 \text{ g kg}^{-1}$ de peso vivo (Mendes & Oliveira, 2004).

Quanto ao Regulamento (CE) N.º 466/2001 da Comissão de 8 de Março de 2001, o teor máximo de Cd nos produtos hortícolas de folha é de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso fresco.

2.4.2.2 Cobre

O cobre (Cu) é um micronutriente essencial a todos os organismos vivos (Wójcik *et al.*, 2009), apresentando-se nas células sob a forma Cu^+ e Cu^{2+} (Yruela, 2009). As plantas necessitam de Cu como cofator catalítico para muitos processos biológicos, nomeadamente, respiração, fotossíntese, transporte de ferro, fixação de nitrogénio, proteção do stresse oxidativo, crescimento normal e desenvolvimento (Wójcik *et al.*, 2009).

A concentração de Cu^{2+} em solução é muito baixa, diminuindo com o aumento do pH, pelo que em solos alcalinos ocorre a formação de compostos insolúveis (como o hidróxido de cobre e hidroxicarbonato de cobre) e aumenta a adsorção aos coloides. No que diz respeito à concentração de quelatos de cobre (Cu^+), esta é pouco influenciada pela reação do solo, dado que as plantas absorvem Cu principalmente a partir de quelatos de cobre (II) (Varennnes, 2003). Deste modo, a toxicidade do Cu é maior em solos ácidos, onde há uma maior disponibilidade do elemento devido às condições existentes.

A acumulação de Cu nos solos pode ser uma consequência das propriedades naturais do solo, práticas agrícolas, como o uso de fertilizantes contendo Cu, resíduos orgânicos, lamas de depuração, fungicidas e bactericidas ou de outras atividades antropogénicas (exploração mineira, eliminação de resíduos, etc.) (Martins & Mourato, 2006). A concentração deste elemento nos solos varia frequentemente entre 1 e 60 mg Cu kg^{-1} de solo, sendo muito superior em solos que estejam contaminados com o metal (Lamas, 2012).

Quando as plantas estão expostas a certos iões metálicos, o balanço do metabolismo de radicais livres é alterado (Mithofer *et al.*, 2004). Este micronutriente promove o stresse oxidativo sobretudo através de reações de oxidação-redução, como é o caso das reações de Fenton (Figura 5). Estas são catalisadas por metais de transição, como o Cu^{2+} , que estimulam reações de oxidação convertendo o H_2O_2 em HO^\bullet . Os iões metálicos oxidados passam por uma redução numa reação subsequente com os radicais superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Outro mecanismo que,

independentemente da presença do metal, também origina radicais HO^\bullet diretamente de H_2O_2 e $\text{O}_2^{\bullet-}$, designa-se por reação de Haber-Weiss (Mithofer *et al.*, 2004; Cuypers *et al.*, 2010).

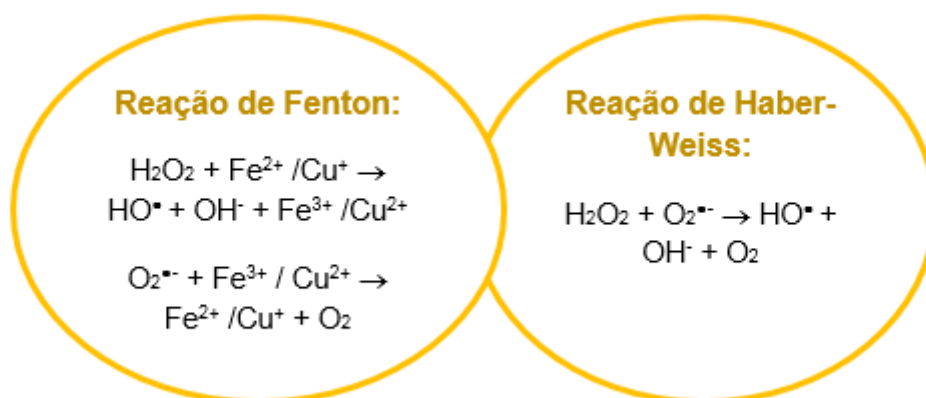


Figura 5 – Reações de Fenton e Haber-Weiss.

(Adaptado de Mithother *et al.*, 2004)

Sendo o radical HO^\bullet uma das moléculas mais reativas nos sistemas biológicos, a sua formação pelas reações de Fenton e Haber-Weiss pode ser evitada mantendo a concentração de metais nas células baixa (Möller *et al.*, 2007). O O_2 resultante fica disponível para reagir e iniciar as reações sequenciais no mecanismo de produção das ROS.

Para plantas, as concentrações normais de Cu variam entre 5 a 20 mg Cu kg⁻¹ de matéria seca (Varennnes, 2003). No entanto, a absorção de Cu pelas plantas em concentrações elevadas, torna-o fitotóxico para as células afetando o desenvolvimento da planta devido a interferências diretas ou indiretas com diversos processos fisiológicos. O excesso de Cu pode influenciar as espécies de maneiras diferentes e causar diversos efeitos conforme o estado de desenvolvimento da planta na qual o metal foi aplicado, a concentração de Cu e a duração da ação. Têm sido feitas referências do excesso de Cu em plantas, que indicam que este acontecimento pode afetar alterações nos parâmetros de crescimento, conteúdo mineral e teor de clorofila, e muitas atividades enzimáticas. (Martins & Mourato, 2006). Um sintoma inicial da toxicidade de Cu é a clorose foliar intervenal. Normalmente a clorose tem a forma de manchas brancas ou cremes ou lesões. Com o aumento da exposição, as pontas das folhas e as margens podem tornar-se necróticas. No caso de toxicidade aguda, as folhas podem murchar antes de se tornarem necróticas (Reichman, 2002). Na presença de elevadas concentrações de Cu ocorre deficiência de Fe, dado que o Cu o substitui em diversas proteínas (Varennnes, 2003).

2.4.2.3 Arsénio

O arsénio é um elemento naturalmente presente na composição das rochas encontrando-se nos solos em concentrações de 0,5 a 35 mg kg⁻¹, consoante o tipo de solo em questão (Rezanka & Sigler, 2008). No entanto são algumas atividades humanas que devem ser tomadas em atenção quando se refere a contaminação de compartimentos ambientais por arsénio. As fontes antrópicas de arsénio podem ser explorações mineiras, agricultura e atividades não agrícolas, sendo este elemento industrialmente utilizado para fabricação de inúmeros produtos, incluindo vidro, cerâmica, produtos eletrónicos, cosméticos e fogos-de-artifício. Como metal tóxico, a sua presença nos alimentos constitui um elevado risco para a saúde humana e animais. (Gupta & Sandalio, 2012).

O solo contaminado com As é uma das principais fontes de As na água potável, sendo fundamental anular os seus efeitos nocivos para proteger a vida humana e a produção agrícola. A fitorremediação é uma técnica utilizada para limpar os locais poluídos com As, incluindo as águas subterrâneas, que está a ganhar atenção devido às preocupações ambientais e aos custos associados com os processos de remediação convencionais (Singh & Ma, 2006).

Do ponto de vista químico, o arsénio (As) é classificado como metaloide (Ferreira, 2006), isto é, um elemento de propriedades intermédias entre as dos metais e as dos não-metais. Na natureza apresenta diversos números de oxidação e os mais comuns são o (III) e o (V), sendo o As (III) a forma mais disponível para as plantas. Os microrganismos do solo atuam sobre o As modificando o número de oxidação ou metilando-o. Algumas das formas reduzidas ou metiladas são voláteis e perdem-se no solo, persistindo aí arsenatos e arsenitos (Varennnes, 2003). Deste modo, em condições oxidantes predominam os arsenatos enquanto em condições redutoras estes são reduzidos a arsenitos, podendo também ser encontrado arsénio na sua forma elementar (Adriano, 1986). A aplicação de adubos fosfatados agrava a toxicidade de As, pois os iões fosfato competem eficazmente com o As para os locais de adsorção, substituindo-o e lançando-o na solução do solo (Varennnes, 2003).

Relativamente às plantas, os principais sintomas quando expostas ao As vão desde a inibição de crescimento das raízes até à morte (Meharg & Hartley-Whitaker, 2002). A maioria das plantas tolera concentrações do metaloide no solo entre 1 a 50 mg kg⁻¹ (Kabata-Pendias & Pendias, 2001; Mascher *et al.*, 2002)

O arsénio tende a concentrar-se maioritariamente nas raízes das plantas e nas folhas mais velhas (Kabata-Pendias & Pendias, 2001), encontrando-se em menores concentrações nas folhas mais novas e caules, e em concentrações ainda mais baixas nas sementes e frutos (Hartley & Lepp, 2008).

A toxicidade do As para os animais e Homem, deve-se principalmente à ingestão de água contaminada com o elemento e não propriamente ao consumo de plantas (Varennnes, 2003).

Segundo o Regulamento (CE) N.º 396/2005 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 23 de Fevereiro de 2005, referente aos limites máximos de resíduos de pesticidas no interior e à superfície dos géneros alimentícios e dos alimentos para animais (origem vegetal ou animal), o limite máximo de arsenito de sódio nos produtos alimentares é de 0,01 mg kg⁻¹ de peso fresco.

2.4.2.4 Salinidade por NaCl

A origem natural dos sais no solo está relacionada com fenómenos que traduzem a desintegração dos minerais encontrados nos solos e nas rochas. Estes sais são transportados pelas águas e armazenados nos solos, acumulando-se à medida que a água vai sendo evaporada ou consumida pelas culturas, dando origem ao processo de salinização. No entanto, os problemas de salinidade também têm sido associados à água utilizada na irrigação (Oliveira *et al.*, 2010). Devido à falta de recursos hídricos adequados na agricultura, muitos produtores são forçados a utilizar água salobra para a irrigação das culturas. Em muitas áreas de produção, o uso de água de baixa qualidade para irrigação bem como a aplicação de quantidades excessivas de fertilizantes são as principais razões para o aumento da salinidade do solo (Gheyi *et al.*, 2010).

A salinidade do solo constitui um sério problema em regiões áridas e semiáridas irrigadas, onde o teor de sal é naturalmente elevado e a precipitação pode ser insuficiente para lixiviação, limitando a produção agrícola e reduzindo a produtividade das culturas (Hafsi *et al.*, 2010). Os sais acumulam-se na camada superior do solo, resultante da evapotranspiração que por sua vez provoca um aumento na água subterrânea que contém sais. Este procedimento pode ocorrer por irrigação sobretudo se a água for rica em sais, sendo o efeito marcado onde a água subterrânea está próxima da superfície, como acontece nas depressões ou nos locais de baixa altitude e quando a água de irrigação entra em contacto com a água subterrânea (Mengel & Kirkby, 2001).

As plantas, consoante a resposta de crescimento para níveis elevados de sal, podem ser divididas em dois grupos, nomeadamente as plantas halófitas, que crescem naturalmente em ambientes salinos (cerca de 300 kmol m⁻³ a 600 kmol m⁻³ NaCl) e apresentam vários mecanismos de adaptação (tolerância ao sal), e as plantas não halófitas ou glicófitas, que envolvem a maioria das espécies de culturas e cuja tolerância ao sal é relativamente baixa. Quanto às plantas glicófitas, que sofrem de salinidade, estas apresentam um desequilíbrio de iões K⁺/Na⁺ no tecido da planta, sendo muitas vezes acompanhada com um grande excesso de Na⁺. A capacidade das plantas para manter a homeostase de K⁺ e as baixas concentrações de Na⁺ no citoplasma constitui um fator importante na tolerância da planta ao sal (Mengel & Kirkby, 2001).

Os efeitos da salinização afetam o crescimento e desenvolvimento das plantas mais sensíveis e diferentes processos metabólicos, como a assimilação de CO₂, a síntese proteica,

respiração e muitas vezes promove a síntese de solutos compatíveis. No que diz respeito ao crescimento, a presença de sais solúveis no meio pode atingir as plantas de diversas maneiras: estas podem sofrer de stresse hídrico, pois um solo salino geralmente contém uma quantidade abundante de água, mas de água de baixa disponibilidade; as concentrações elevadas de íons específicos podem ser tóxicas e induzir desordens fisiológicas (Na^+ , Cl^-); e desequilíbrios iônicos intracelulares (K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}) que podem ser causados por uma elevada concentração de sal (Mengel & Kirkby, 2001).

As plantas que se desenvolvem em zonas salinas são muitas vezes atrofiadas com pequenas folhas amorfas verde azuladas e o crescimento da parte aérea é normalmente mais reduzido do que o crescimento da raiz. Quanto ao crescimento e desenvolvimento de folhas jovens, estas são geralmente favorecidas sobre folhas maduras, as quais podem acumular grandes concentrações de íons tóxicos levando à morte prematura a fim de garantir o desenvolvimento das folhas jovens. Uma desvantagem adicional da elevada concentração de sal na solução do solo é o seu efeito osmótico. Isto é, concentração elevada de solutos significa um baixo potencial de água e, por conseguinte, a absorção de água pelas raízes das plantas é restrita (Mengel & Kirkby, 2001).

Segundo Mendes & Oliveira (2004), os indivíduos adultos necessitam de cerca de 1 a 3 g dia^{-1} de NaCl e regra geral doses superiores não são perigosas dada a eficiência dos rins em excretar este elemento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

No decorrer deste trabalho foi realizado um ensaio de crescimento para avaliar o efeito de alguns elementos potencialmente tóxicos (PTE) e de salinidade (NaCl) no desenvolvimento da planta de rúcula. Para este ensaio, além da avaliação da resistência das plantas à salinidade, os PTE utilizados foram o Cd, Cu e As, simulando sempre condições reais de utilização de meios contaminados. Este teve a duração total de 59 dias, com um período de exposição aos contaminantes de 39 dias.

3.1 Material Vegetal

Para o ensaio foram utilizadas sementes de rúcula (*Eruca sativa*) da variedade cultivada (Figura 6), adquiridas numa superfície comercial.

A rúcula é uma planta da família *Brassicaceae*, que se caracteriza por rápido crescimento vegetativo e ciclo curto. Apesar de a sementeira ser recomendada o ano todo, o seu desenvolvimento normal é favorecido por condições de temperaturas amenas (15 a 18 °C), pelo que a temperaturas mais elevadas, a planta antecipa a fase reprodutiva, emitindo prematuramente ramificações florais que prejudicam a produção, tornando as folhas menores e mais rijas.



Figura 6 - Sementes de rúcula.

3.2 Ensaio de crescimento

Para o ensaio de crescimento preparam-se 10 tabuleiros, 2 para cada PTE (Cd, Cu e As), 2 tabuleiros para o ensaio com NaCl e 2 tabuleiros para as amostras Controlo. Em cada tabuleiro foram colocadas 30 cilindros de turfa com 5 sementes cada uma (Figura 7).



Figura 7 – Preparação das turfas para a germinação de sementes de rúcula.

Os tabuleiros foram instalados numa estufa exterior do Horto da Unidade de Investigação de Química Ambiental (UIQA), do Instituto Superior de Agronomia. As turfas foram mantidas sempre humedecidas em água desionizada de modo a fornecer um meio adequado à germinação das sementes. A rega com água desionizada teve a duração de 20 dias (Figura 8).




Figura 8 – Germinação de sementes rúcula.

Ao fim de 20 dias aplicou-se solução nutritiva de HOAGLAND contendo 50 μM de Cd, 50 μM de As, 100 μM de Cu, e 25 mM de NaCl, nos respetivos tabuleiros. O cádmio foi aplicado na forma de cloreto de cádmio ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), o arsénio na forma de arsenato de sódio ($\text{AsHNa}_2\text{O}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e o cobre na forma de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

A preparação da solução nutritiva de HOAGLAND contaminada e de NaCl para rega encontra-se representada no Quadro 1.

Quadro 1 - Preparação de garrafões de 5L com as soluções *stock* dos contaminantes e NaCl analisados mais solução nutritiva HOAGLAND.

0 μM Controlo	Solução Nutritiva HOAGLAND	
50 μM Cd	Solução Nutritiva HOAGLAND + 0,05 M de Cloreto de Cádmio	
50 μM As	Solução Nutritiva HOAGLAND + 0,05 M de Arsenato de Sódio	
100 μM Cu	Solução Nutritiva HOAGLAND + 0,1 M de Sulfato de Cobre	
25 mM NaCl	Solução Nutritiva HOAGLAND + 7,3050 g de Cloreto de Sódio	

A composição da solução nutritiva de HOAGLAND encontra-se descrita Quadro 2.

Quadro 2 - Composição da Solução Nutritiva de HOAGLAND.

Solução nutritiva de HOAGLAND	Reagentes	Concentração
Solução <i>stock</i> de Macronutrientes	Nitrato de Cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	6 mM
	Nitrato de Potássio (KNO_3)	6 mM
	Sulfato de Magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2,5 mM
	Fosfato de Potássio monobásico (KH_2PO_4)	1 mM
Solução <i>stock</i> de Micronutrientes	Ácido Bórico (H_3BO_3)	100 μM
	Sulfato de Manganês ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	100 μM
	Sulfato de Zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	30 μM
	Molibdato de Sódio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1 μM
	Cloreto de Cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,1 μM
	Sulfato de Cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,1 μM
Solução <i>stock</i> de Fe-EDTA	—	75 μM

As colheitas do material vegetal foram realizadas nos dias 41, 48, 55 e 59, correspondendo à primeira, segunda, terceira e quarta, respetivamente. Nestes dias, só após estas serem efetuadas é que se aplicaram as soluções, tendo o cuidado de nos restantes dias colocar solução sempre que necessário, de modo a manter as turfas húmidas.

3.3 Determinações analíticas

Para avaliar o efeito dos PTE em estudo e do NaCl nas plantas de rúcula fizeram-se diversas determinações analíticas, como a biomassa, o teor de matéria seca, o teor de clorofila pelo método não destrutivo com o aparelho *Hansatech* e a composição mineral.

3.3.1 Determinação do teor de matéria seca

Durante a realização da colheita das plantas, houve sempre o cuidado de separar o substrato da parte aérea, tendo sido apenas a fração vegetal analisada. As folhas, depois de pesadas em fresco, foram colocadas na estufa a 80 °C onde permaneceram durante uma semana, até massa constante, determinando-se nessa altura a massa seca. Com as massas determinadas, secas e frescas, foi possível obter o teor de massa seca, em percentagem (%):

$$\% \text{ Matéria Seca} = \frac{\text{Matéria Seca}}{\text{Matéria Fresca}} \times 100$$

As amostras secas foram pesadas, moídas num almofariz com pilão e armazenadas em frascos de plástico, os quais permaneceram guardados até se proceder à preparação das amostras para determinação do conteúdo mineral.

3.3.2 Determinação da clorofila pelo método não destrutivo (*Hansatech*)

Em todas as colheitas do material vegetal, mediu-se sempre a clorofila pelo método não destrutivo com o aparelho *Hansatech* (Figura 9), tendo sido realizadas medições em 10 folhas das plantas de cada tabuleiro. Em cada folha efetuaram-se medições em três zonas distintas, tanto do lado direito como do esquerdo, relativamente à nervura principal, devido às grandes diferenças que existem em toda a área da folha.



Figura 9 - Determinação não destrutiva de clorofila com *Hansatech*.

3.3.3 Determinação do conteúdo mineral

A determinação do conteúdo mineral baseou-se na utilização do material vegetal proveniente da determinação do teor de matéria seca. As folhas foram maceradas até se reduzirem a pó, tendo-se transferido para tubos de *teflon* cerca de 0,5 g de amostra e 5 mL de ácido nítrico (HNO_3). Após os tubos terem sido devidamente fechados, com amostra e outro só com ácido nítrico (HNO_3), foram ligados a um equipamento que os submeteu a micro-ondas (CEM MDS 2000). Neste método, as amostras são submetidas a elevadas temperaturas e pressões, o que permite efetuar rapidamente a digestão de toda a matéria orgânica libertando dióxido de carbono e vapor de água. Depois de finalizado o processo de digestão ácida (90 minutos) e de arrefecidos os tubos à temperatura ambiente, transferiu-se, na *hotte*, o seu conteúdo para balões volumétricos de 25 mL, sendo o volume posteriormente acertado com água desionizada.

Os minerais determinados no material vegetal foram o Cd, As, Na, K, Mg, Zn, Mn, Fe, Cu e Ca. Relativamente ao Cd, este foi determinado por espectrofotometria de absorção atômica (EAA) em câmara de grafite, enquanto os restantes elementos determinaram-se por espectrofotometria de absorção atômica de chama. Na figura seguinte (Figura 10) é possível observar o interior do micro-ondas onde as amostras foram digeridas.

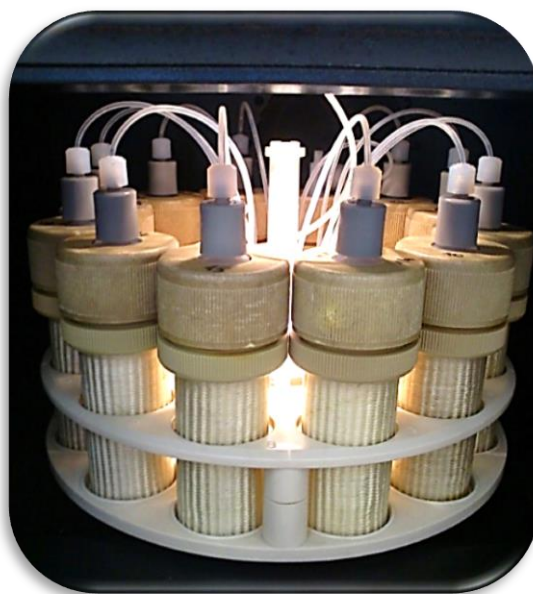


Figura 10 - Carrocel de amostras no interior do micro-ondas (CEM MDS 2000).

3.4 Tratamento estatístico

Para o tratamento estatístico dos resultados utilizou-se o programa estatístico “*SPSS Statistics 17.0*”, tendo sido aplicada a análise de variância a um fator (ANOVA) de forma a avaliar o efeito das diferentes concentrações de metais nas plantas de rúcula. Para comparação das médias utilizou-se o teste *Tukey*, a um nível de confiança de 95 %.

No ensaio realizado as letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$), entre o Controlo e as diversas concentrações PTE ou NaCl para um dado dia. As barras de erro das colunas nos gráficos apresentados indicam o desvio padrão (DP) da média das amostras.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Germinação das sementes

A germinação das sementes de rúcula em cilindros de turfa ocorreu ao 5º dia, tendo sido por isso um crescimento homogêneo (Figura 11) que se verificou até ao final do ensaio.

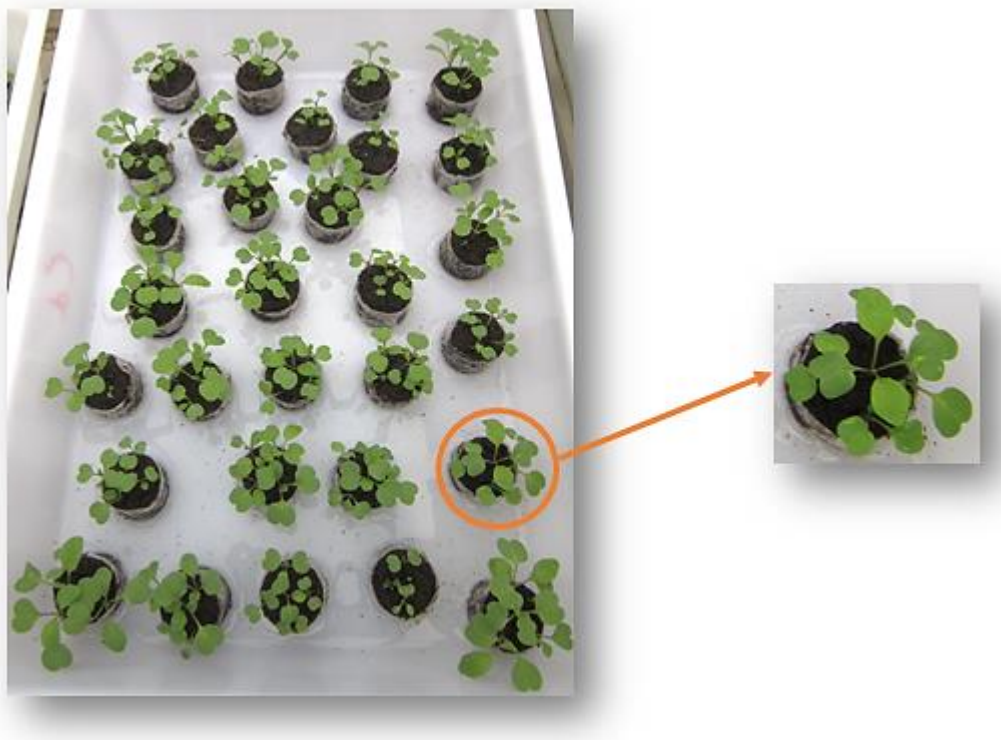


Figura 11 - Germinação de sementes de rúcula em turfas.

Na Figura 12 são apresentados registos fotográficos das plantas colhidas para as determinações analíticas nos ensaios com Cd, Cu, As e NaCl, respetivamente, ao fim de 39 dias de exposição a cada um dos contaminantes estudados (Duração total do ensaio: 59 dias). Ao longo dos quatro tempos de colheita é possível verificar um bom desenvolvimento das plantas de rúcula, à exceção das amostras contaminadas com NaCl, que exibiram menor estatura e folhas mais pequenas e verde escuras. Relativamente ao teor de clorofila, observa-se uma diminuição bastante visível nas plantas contaminadas com Cd e Cu a partir da colheita do dia 55, apresentando folhas com uma tonalidade mais clara que é caracterizada pelo aparecimento de cloroses.

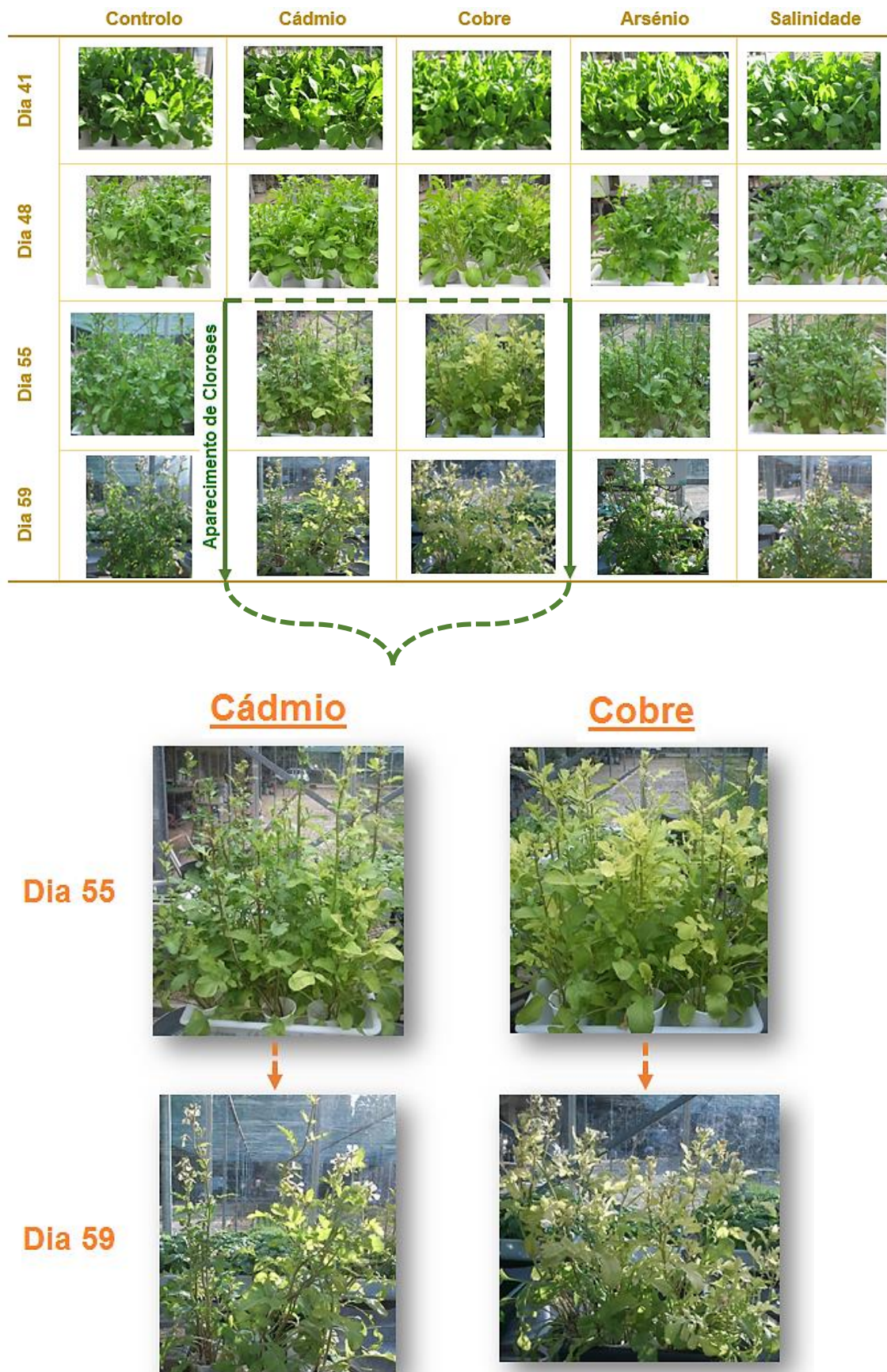


Figura 12 - Ensaio de crescimento com plantas de rúcula nos dias de colheita.

4.2 Efeito dos PTE e do NaCl

Para este ensaio, os parâmetros avaliados nas plantas foram a biomassa, teor de matéria seca e clorofila.

4.2.1 Biomassa

Na Figura 13 é apresentado o gráfico da variação média da biomassa total de plantas de rúcula sem contaminação (Controlo, C) e contaminadas com Cd, Cu, As e NaCl durante 39 dias de exposição aos contaminantes.

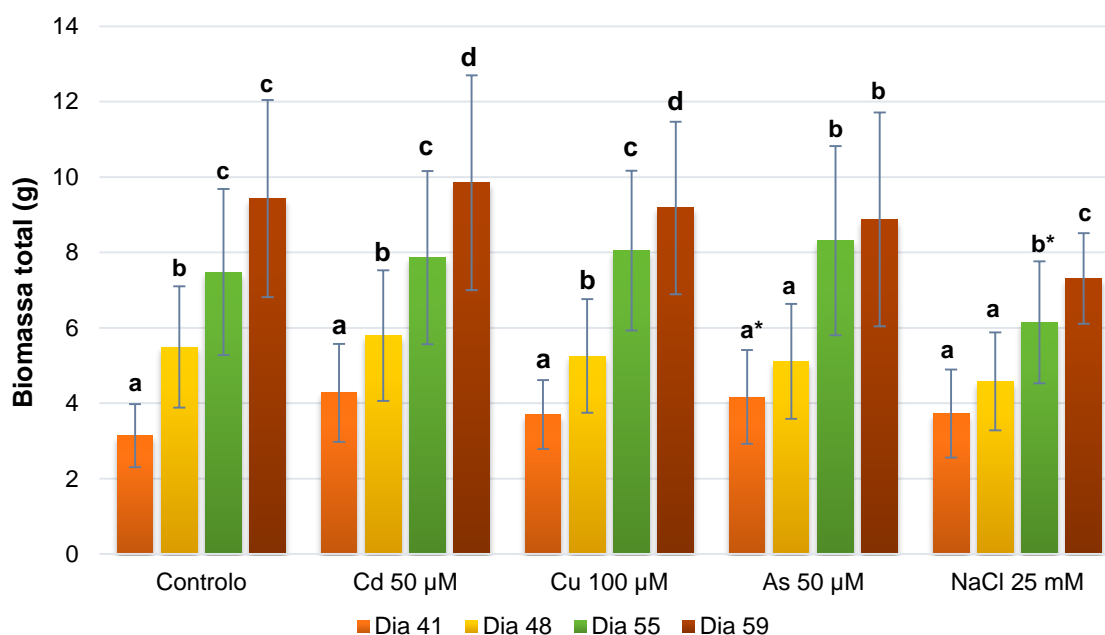


Figura 13 - Variação média da biomassa total (g) de plantas controlo (C) e expostas a stresse com 50 µM de Cd, 100 µM de Cu, 50 µM de As e 25 mM de NaCl, durante 39 dias de contaminação.

Legenda: As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre diversas concentrações PTE ou NaCl e o Controlo para um dado dia; $n=10$.

Para as cinco modalidades consideradas (C, Cd, Cu, As e NaCl), verificou-se uma tendência para o aumento gradual da biomassa total ao longo do tempo, demonstrando haver diferenças significativas ao longo do tempo de crescimento, mesmo no caso das amostras contaminadas. No entanto, o ensaio com NaCl foi o que apresentou menor quantidade de biomassa. Além disso, observa-se uma diminuição significativa deste parâmetro para o dia 55 comparativamente às amostras de controlo. De acordo com Mengel & Kirkby (2001), a

acumulação de sal no solo conduz a um pobre crescimento das culturas, o que nos leva a crer que a salinidade interfere na produtividade da planta.

No ensaio com Cd e Cu é possível visualizar que de todas as contaminações analisadas, estas foram as únicas que apresentaram ao longo de todo o período de exposição, valores da biomassa semelhantes aos obtidos nas amostras de controlo pelo que se pode concluir que, nas condições do ensaio, estes contaminantes não afetaram significativamente a biomassa total ao longo do tempo.

Relativamente ao ensaio com As, verifica-se que apenas o dia 41 mostrou um aumento significativo da biomassa total face ao controlo. Este facto poderá estar relacionado com o desencadear de algum mecanismo de defesa da planta em resposta à presença de As, que é eficaz para tempos mais curtos de exposição.

4.2.2 Teor de matéria seca

No gráfico da Figura 14 são apresentadas as variações do teor de matéria seca para o ensaio com as modalidades em estudo, nomeadamente, C, Cd, Cu, As e NaCl.

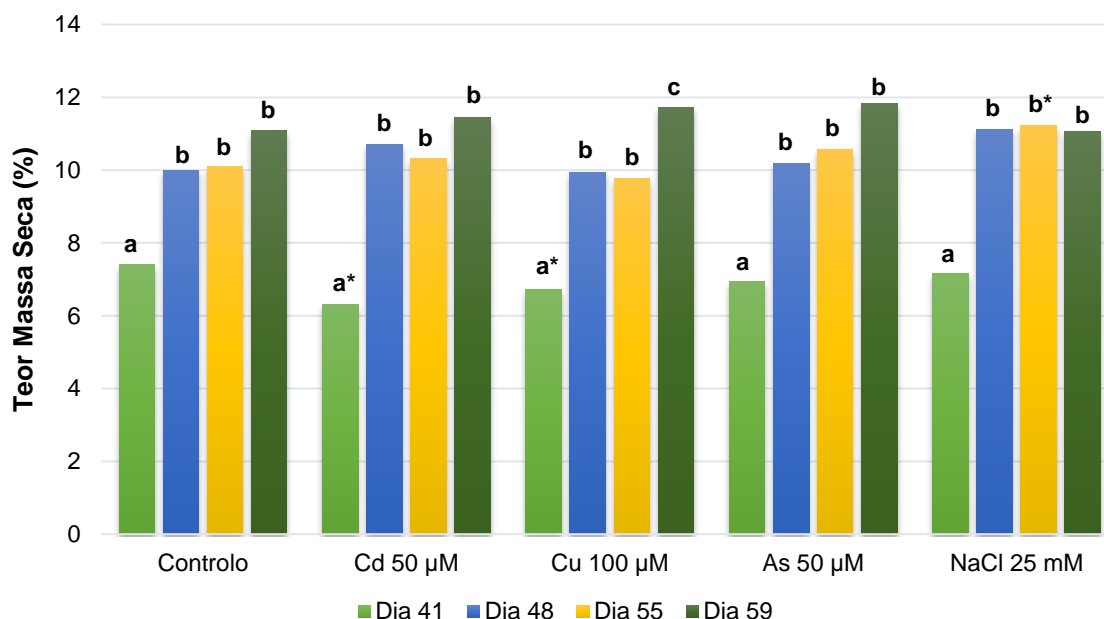


Figura 14 - Teor de matéria seca (%) de folhas de rúcula de plantas controlo e contaminadas com 50 µM de Cd, 100 µM de Cu, 50 µM de As e 25 mM de NaCl durante 39 dias de contaminação.

Legenda: As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre diversas concentrações PTE ou NaCl e o Controlo para um dado dia; $n=10$.

Pela análise da Figura 14 verifica-se que houve uma tendência para o aumento do teor de matéria seca em todas as modalidades estudadas (C, Cd, Cu, As e NaCl). No entanto, não houve na maioria dos casos uma variação significativa dos valores da matéria seca em relação ao controlo, para os diferentes PTE testados e para os diferentes tempos de crescimento da planta.

O ensaio com As foi o único que ao longo de todo o tempo de exposição não apresentou diferenças significativas no teor de matéria seca, comparativamente com as amostras de controlo. Sendo assim, a exposição a este PTE não teve influência negativa no teor de matéria seca (%) durante o período de ensaio.

Relativamente ao ensaio com Cd e Cu, apenas no dia 41 as plantas apresentaram um teor de matéria seca significativamente inferior às plantas controlo, situação que não se verifica para os restantes tempos de colheita que mostraram valores comparativamente semelhantes aos obtidos no ensaio de controlo. Os valores obtidos para a contaminação com Cd a partir do dia 48, podem estar relacionados com o facto de este elemento diminuir a absorção não só de alguns elementos minerais como também de água, podendo indicar a existência de algum efeito tóxico na planta (di Toppi & Gabbrielli, 1999).

Contudo, também foi visível um aumento significativo do teor de matéria seca para a contaminação com NaCl no dia 55, analogamente às amostras de controlo, indicando um possível mecanismo de restrição na absorção de solução pelo sistema radicular das plantas induzido pelo NaCl. No entanto, para o dia 59 o aumento verificado já não foi estatisticamente significativo em comparação com as amostras de controlo.

4.2.3 Quantificação da clorofila (*Hansatech*)

No gráfico seguinte (Figura 15) estão representadas as variações adimensionais do teor de clorofila, para o ensaio realizado com C, Cd, Cu, As e NaCl, obtidas pelo equipamento portátil *Hansatech*.

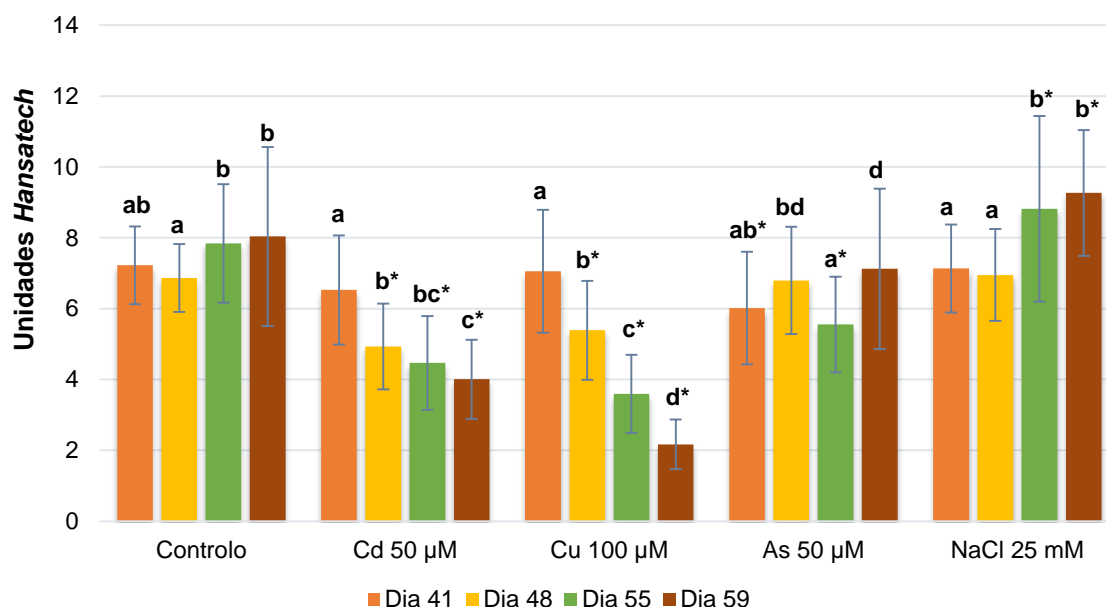


Figura 15 - Teor médio de clorofila (Unidades *Hansatech*), para o ensaio de plantas controle e contaminadas com 50 µM de Cd, 100 µM de Cu, 50 µM de As e 25 mM de NaCl durante 39 dias de contaminação.

Legenda: As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre diversas concentrações PTE ou NaCl e o Controle para um dado dia; $n=10$.

Analisando o gráfico da Figura 15 é possível observar uma diminuição evidente do teor de clorofila para o ensaio com Cd e Cu. Ambos os ensaios apresentam diferenças significativas entre si, tal como nas restantes contaminações. Além disso, a partir do dia 48 verifica-se um decréscimo significativo do teor de clorofila das plantas contaminadas com Cd e Cu quando comparadas com as do controle, pelo que a exposição a estes contaminantes afetou negativamente o parâmetro em estudo. Os menores valores obtidos pelo aparelho *Hansatech* também são confirmados pelos sintomas visíveis do efeito tóxico do Cd e do Cu. As plantas de rúcula contaminadas com estes elementos apresentaram uma tonalidade mais clara, como é visível pela Figura 16, demonstrando o aparecimento de clorose generalizada com maior incidência nas folhas mais jovens. Para o contaminante Cd, as folhas mais jovens são as mais cloróticas e mais pequenas, ao contrário do Cu cujas folhas mais jovens além de ficarem amarelas, o seu crescimento não é tão afetado.



Figura 16 - Sintoma visível do efeito tóxico dos contaminantes Cd (A) e Cu (B).

Relativamente às amostras contaminadas com As, além de se verificarem variações no teor de clorofila ao longo do ensaio, também foi possível observar diminuições significativas do parâmetro nos dias 41 e 55, comparativamente com os ensaios de controlo. A redução dos teores de clorofila demonstra que a adição de As influenciou negativamente o nível de clorofila, apesar de não ter sido detetado sintomas visíveis do seu efeito tóxico nas plantas, por exemplo cloroses, como se pode observar na Figura 17.



Figura 17 – Ausência de sintomas visíveis do efeito tóxico do contaminante As.

Quanto ao ensaio com NaCl, é possível observar uma tendência para o aumento do teor de clorofila. Esse efeito manifesta-se sobretudo para os dias 55 e 59 que demonstraram níveis de clorofila significativamente superiores aos das amostras de controlo, sendo estas diferenças visíveis pela existência de folhas ligeiramente mais escuras. O stresse por NaCl é mais evidente no conteúdo de clorofila e área foliar, sendo as folhas jovens as que apresentam uma tonalidade mais escura e com menor área foliar. No entanto, também é possível verificar que as folhas velhas desenvolveram clorose (Figura 18), tendo posteriormente caído devido a um período prolongado de stresse.



Figura 18 – Sintoma visível do efeito tóxico do contaminante NaCl.

4.3 Análise dos elementos minerais nas folhas

A avaliação do teor mineral permitiu verificar a influência da aplicação de cada um dos PTE (Cd, Cu e As) e NaCl nos restantes minerais naturalmente presentes nos tecidos das plantas de rúcula. Os minerais estudados foram o arsénio (As), cádmio (Cd), cálcio (Ca), cobre (Cu), ferro (Fe), magnésio (Mg), manganês (Mn), potássio (K), sódio (Na) e zinco (Zn). As concentrações dos elementos acima mencionados estão apresentadas nos gráficos seguintes (Figura 19 à 28).

4.3.1 Arsénio

No gráfico da Figura 19 está representado o teor mineral nas plantas para o elemento Arsénio.

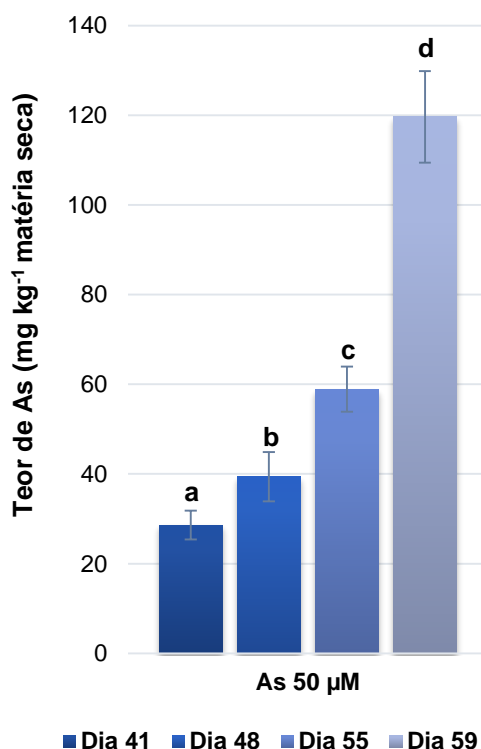


Figura 19 - Teor de As (mg kg⁻¹ matéria seca) em folhas de plantas de rúcula, durante 39 dias de contaminação.

Legenda: As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl; $n=3$.

Pela análise do gráfico (Figura 19) é possível observar unicamente o teor de As nas amostras contaminadas com este metal, devido à sua presença não ter sido detetada nas restantes modalidades estudadas. Isto significa que nas amostras não contaminadas o teor de As encontra-se em concentrações abaixo do limite de deteção, tal como era esperado, uma vez

que não foi adicionado às soluções nutritivas deste ensaio. Relativamente às amostras contaminadas com As, verificou-se que a concentração deste mineral aumentou ao longo do tempo de exposição.

4.3.2 Cádmio

No gráfico da Figura 20 está representado o teor mineral nas plantas para o elemento Cádmio.

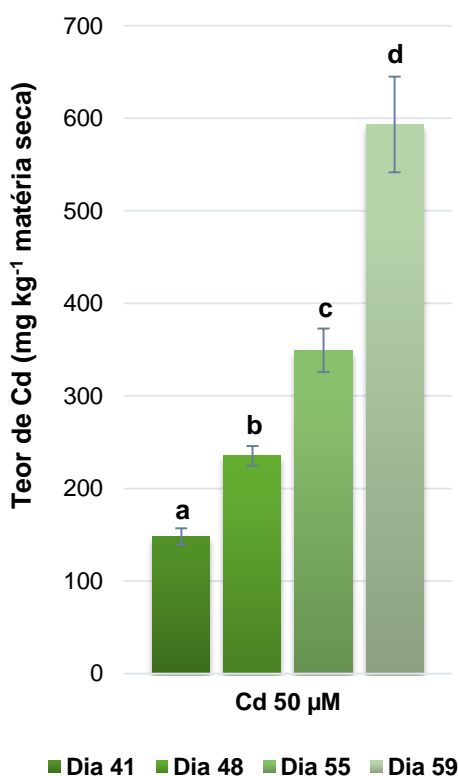


Figura 20 - Teor de Cd (mg kg⁻¹ matéria seca) em folhas de plantas de rúcula, durante 39 dias de contaminação.

Legenda: As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl; $n=3$.

Observando o gráfico da Figura 20, verifica-se que este apenas apresenta o teor de Cd nas amostras contaminadas com este metal, devido à sua presença não ter sido detetada nos restantes ensaios. Isto significa que o teor de Cd encontra-se em concentrações abaixo do limite de deteção tal como era previsto, uma vez que não foi adicionado às soluções nutritivas deste ensaio. Quanto às amostras contaminadas com Cd, confirma-se pela análise da Figura 21 que concentração deste mineral aumentou ao longo do tempo de exposição.

4.3.3 Cálcio

O gráfico da Figura 21 mostra o teor mineral nas plantas para o elemento Cálcio.

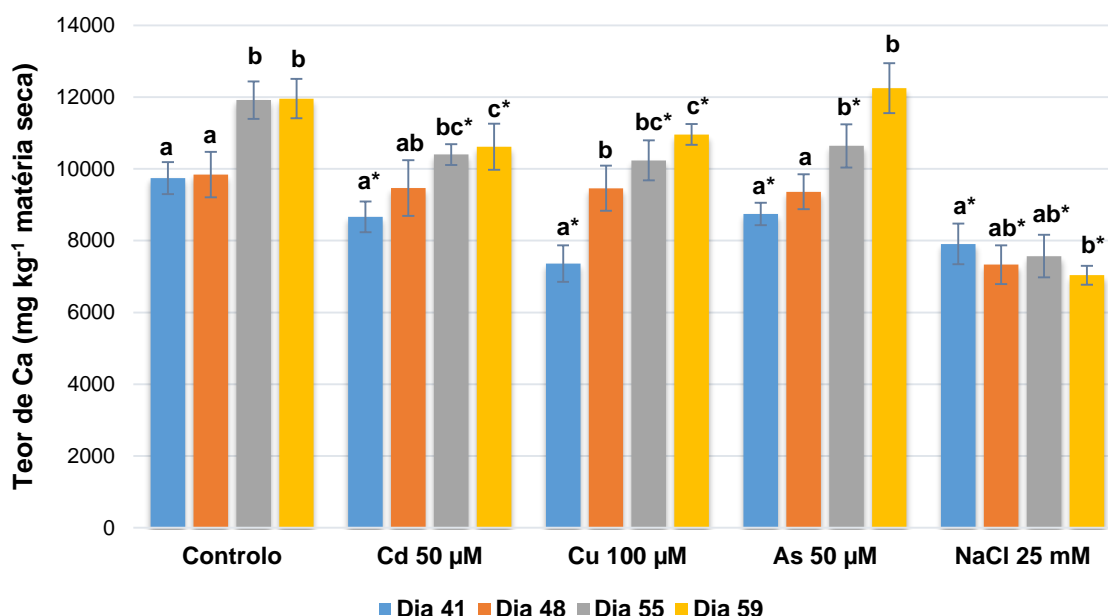


Figura 21 - Teor de Ca (mg kg^{-1} matéria seca) em folhas de plantas de rúcula, durante 39 dias de contaminação.

Legenda: As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre diversas concentrações PTE ou NaCl e o Controlo para um dado dia; $n=3$.

No gráfico da Figura 21 verifica-se uma tendência para o aumento da concentração de Ca ao longo do tempo de exposição. Este aumento é particularmente importante para a alimentação pois a rúcula é considerada um vegetal rico em Ca (Vasconcelos *et al.*, 2011). No entanto, esta tendência não foi visível para a contaminação com NaCl, que mostra uma ligeira diminuição no teor de Ca, pelo que a sua presença reduz a capacidade da planta absorver o mineral Ca, importante para o desenvolvimento das plantas. Isto era de alguma forma esperado, pois segundo Dias e Blanco (2010), incrementos na concentração de NaCl na solução do solo prejudicam a absorção radicular de nutrientes, principalmente de Ca, e interferem nas suas funções fisiológicas. Sendo assim, a capacidade dos genótipos de plantas para manter elevados teores de Ca e baixos níveis de Na dentro do tecido é um dos mecanismos chaves que contribui para expressar a maior tolerância à salinidade, que neste caso parece não existir.

Quanto ao ensaio com NaCl, este foi o que apresentou menores teores de Ca, que por sua vez foram significativamente inferiores aos valores obtidos nas amostras de controlo. Isto significa que a aplicação de NaCl afetou negativamente o teor de Ca. De acordo com Mengel &

Kirkby (2001), desequilíbrios iónicos intracelulares (K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}) podem ser causados por uma elevada concentração de sal.

Nos ensaios com Cd e Cu é possível verificar que todos os tempos de colheita, à exceção do dia 48, apresentam valores significativamente inferiores aos obtidos nas amostras de controlo. Para o contaminante Cd este acontecimento pode estar relacionado com o facto de haver semelhanças entre Cd e Ca na forma iónica, que por sua vez competem entre si para entrar na raiz da planta. De acordo com di Toppi & Gabbrielli (1999) a acumulação de Cd interfere na assimilação, transporte e utilização de diversos elementos como é o caso do Ca.

Relativamente ao contaminante As, também observa-se uma diminuição significativa no teor de Ca mas apenas para os dias 41 e 55. Todos os outros tempos de colheita apresentaram valores de Ca comparativamente semelhantes aos obtidos nas amostras de controlo, tendo-se verificado um aumento gradual deste mineral nas plantas ao longo do tempo, pelo que não foi afetado negativamente pelo contaminante As.

4.3.4 Cobre

O gráfico da Figura 22 mostra o teor mineral nas plantas para o elemento Cobre.

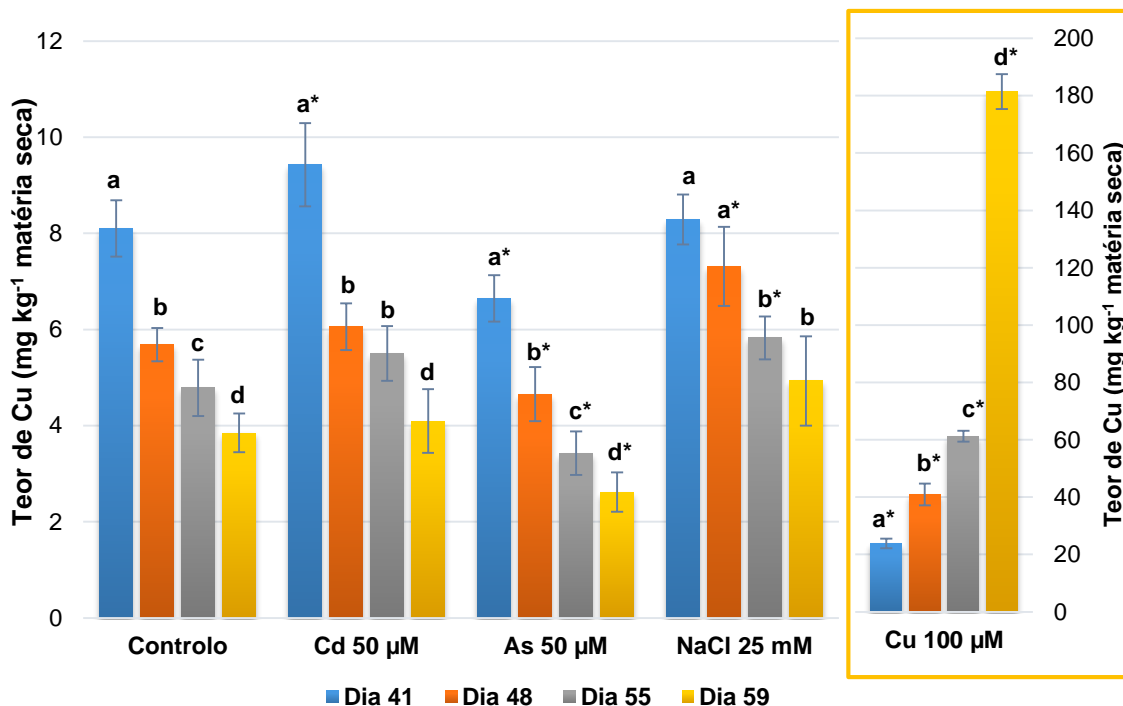


Figura 22 - Teor de Cu (mg kg⁻¹ matéria seca) em folhas de plantas de rúcula, durante 39 dias de contaminação.

Legenda: As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre diversas concentrações PTE ou NaCl e o Controlo para um dado dia; $n=3$.

Na Figura 22 observa-se uma tendência para a diminuição do teor de Cu ao longo do tempo de exposição, à exceção das amostras contaminadas com Cu, sendo esta a única situação em que as plantas apresentaram maiores teores de Cu. Isto já era previsto, uma vez que se analisou o teor do mineral Cu nas amostras contaminadas com este elemento. Comparativamente ao ensaio de controlo, o teor de Cu foi sempre significativamente superior nas amostras contaminadas com Cu. Isto indica que há um aumento da absorção de Cu pela planta, que parece ser maior para tempos mais longos. Nas amostras colhidas no dia 59 verificou-se um aumento considerável do teor de Cu, o que pode indicar a existência de uma perturbação no mecanismo de controlo da absorção dos sistema radicular da planta. Segundo Reichman (2002), com o aumento da exposição, as pontas das folhas e as margens podem tornar-se necróticas, como se pode verificar pela Figura 23.



Figura 23 - Efeito tóxico da exposição prolongada ao Cu.

Relativamente ao ensaio com Cd no dia 41 e NaCl nos dias 48 e 55, verificaram-se valores no teor de Cu significativamente superiores aos obtidos nas amostras de controlo, o que indica que a presença deste contaminante não afetou negativamente a absorção de Cu pelas plantas. Para o caso do Cd, a diminuição dos teores de Cu a partir do dia 48 pode estar relacionado com o estudo de Benavides *et al.* (2005), ou seja, a absorção de iões Cd parece estar em competição para o mesmo transportador transmembranar com nutrientes, como por exemplo o Cu. Desta forma, o Cd ao competir com o Cu vai impedi-lo de entrar pela raiz da planta diminuindo a sua concentração. Este efeito só se faz sentir para tempos de exposição superiores.

Quanto ao ensaio com As, é possível observar que ao longo de todo o período de exposição existe uma diminuição significativa nos teores de Cu em relação às plantas de controlo. Isto leva a crer que há uma interação de As na absorção do Cu, que se manifesta pelo efeito negativo do contaminante As na absorção de Cu pelas plantas.

4.3.5 Ferro

O gráfico da Figura 24 mostra o teor mineral nas plantas para o elemento Ferro.

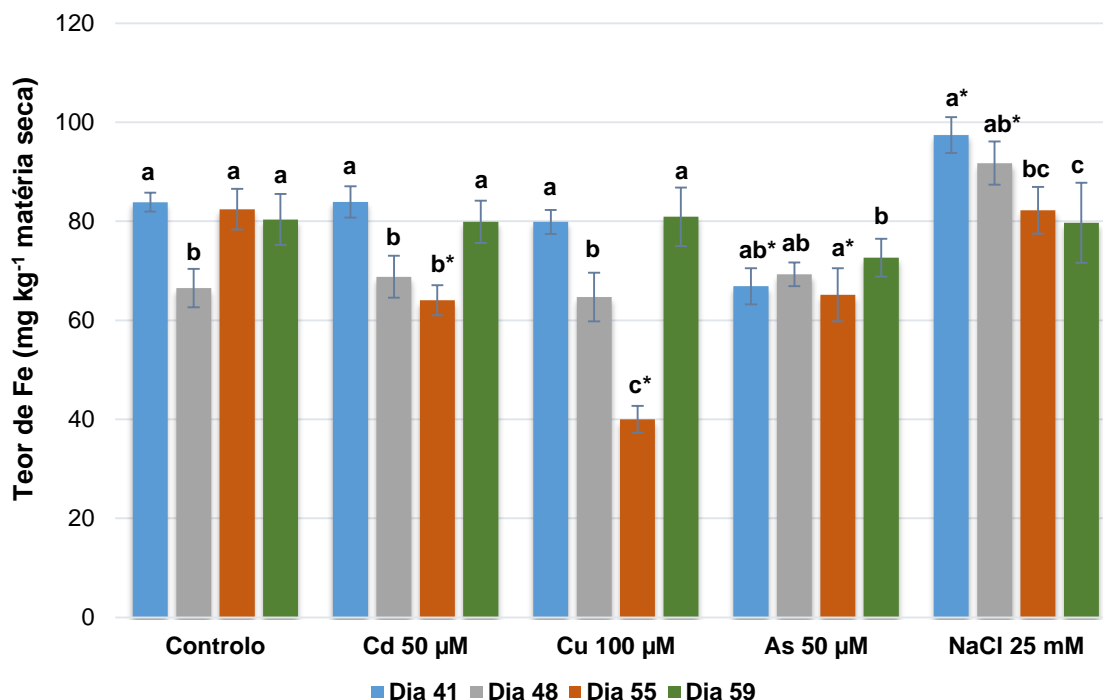


Figura 24 - Teor de Fe (mg kg^{-1} matéria seca) em folhas de plantas de rúcula, durante 39 dias de contaminação.

Legenda: As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre diversas concentrações PTE ou NaCl e o Controlo para um dado dia; $n=3$.

O gráfico da Figura 24 mostra uma tendência geral para a diminuição da concentração de Fe ao longo do tempo, pelo que a presença destes contaminantes nas plantas interfere na sua composição mineral em Fe.

Analisando o ensaio com NaCl, observa-se um aumento significativo do teor de Fe nos dias 41 e 48 relativamente ao controlo, sendo também os dias com maiores valores de absorção de Fe quando comparado com todas as outras modalidades (Cd, Cu e As). Isto pode indicar a existência de estimulação na entrada e mobilização do mineral na planta devido ao bom funcionamento de um sistema de defesa intracelular.

O teor de Fe na contaminação com Cd e Cu apresentou valores comparativamente semelhantes aos das amostras de controlo em todos os tempos de ensaio, à exceção do dia 55 que mostrou ser significativamente inferior. De acordo com Clemens (2006), o sistema de absorção do Fe está regulado de maneira a permitir a entrada de Cd através da sua via de transporte, pelo que na presença de Cd o teor de Fe é relativamente mais baixo. Isto pode explicar o facto de se ter observado perda de clorofila nas folhas, que resulta normalmente de

uma consequência da carência de Fe. Quanto ao contaminante Cu, tal como foi referido anteriormente por Varennes (2003), a sua presença em elevadas concentrações ocorre deficiência de Fe, dado que o Cu o substitui em diversas proteínas. Por esta razão, seria de esperar que aos 59 dias também fosse verificado um valor inferior ao controlo, e esse resultado estaria de acordo com as cloroses verificadas. No entanto, na determinação de Fe que foi efetuada para estas amostras (Cd e Cu) isso não aconteceu.

Relativamente ao ensaio com As, apenas os dias 41 e 55 mostraram um teor de Fe significativamente inferior quando comparado com as amostras de controlo, afetando a sua assimilação pelas raízes das plantas.

4.3.6 Magnésio

O gráfico da Figura 25 mostra o teor mineral nas plantas para o elemento Magnésio.

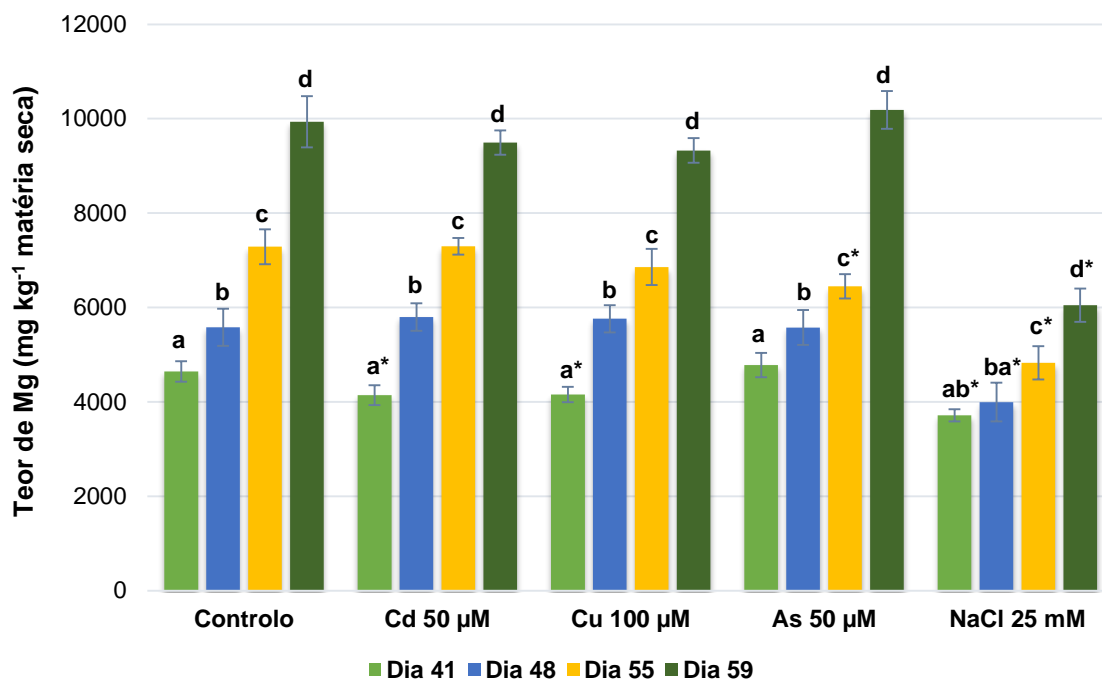


Figura 25 - Teor de Mg (mg kg^{-1} matéria seca) em folhas de plantas de rúcula, durante 39 dias de contaminação.

Legenda: As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre diversas concentrações PTE ou NaCl e o Controlo para um dado dia; $n=3$.

Analisando o gráfico (Figura 25), observa-se um aumento da concentração de Mg ao longo de todo o período de exposição. No entanto, o teor deste mineral para os ensaios com Cd e Cu no dia 41 e As no dia 55 foram significativamente inferiores aos valores obtidos nas amostras de controlo. O mesmo acontece para o ensaio com NaCl, mas para todos os tempos de colheita, sugerindo a hipótese que a adição destes elementos (Cd, Cu, As e NaCl) nos tempos referidos, principalmente para NaCl, influenciou negativamente a entrada e mobilização de Mg na planta. Como já foi referido anteriormente, podem ocorrer desequilíbrios iónicos intracelulares, por exemplo para Mg^{2+} , devido à elevada concentração de sal. Isto pode explicar os baixos teores de Mg na presença de NaCl. Relativamente aos restantes tempos de colheita para Cd, Cu e As, confirma-se pelo gráfico da Figura 25 que a sua adição na solução nutritiva não influenciou significativamente o teor de Mg nas folhas, facto comprovado pela semelhança de valores obtidos com os do ensaio de controlo.

4.3.7 Manganês

O gráfico da Figura 26 mostra o teor mineral nas plantas para o elemento Manganês.

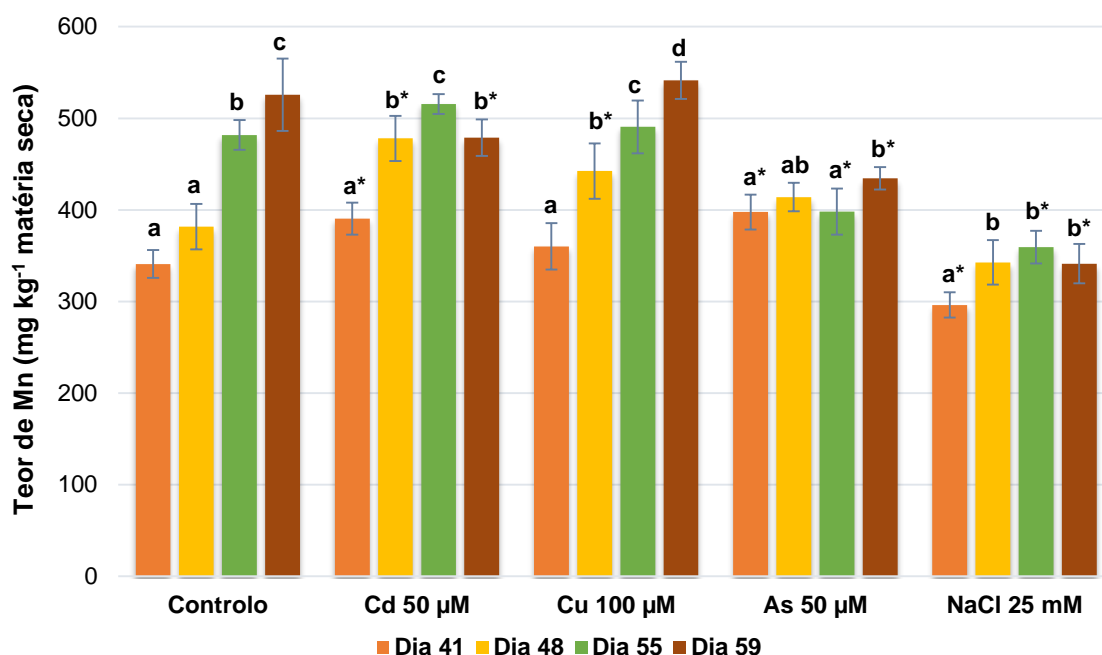


Figura 26 - Teor de Mn (mg kg^{-1} matéria seca) em folhas de plantas de rúcula, durante 39 dias de contaminação.

Legenda: As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre diversas concentrações PTE ou NaCl e o Controlo para um dado dia; $n=3$.

Pela análise do gráfico (Figura 26) verifica-se que no geral houve um aumento do teor de Mn ao longo do tempo de exposição.

No ensaio com Cu, apenas o dia 48 apresentou um teor de Mn significativamente superior ao das amostras de controlo, para o mesmo tempo referido. Quanto aos restantes tempos de colheita (41, 55 e 59), estes apresentaram valores semelhantes aos obtidos no ensaio de controlo, não influenciando negativamente a assimilação de Mn.

No ensaio com Cd é possível observar um aumento significativo do teor de Mn das amostras contaminadas nos dias 41 e 48 face às amostras de controlo. Isto já não se verifica no dia 59, havendo uma quebra que afetou negativamente a absorção de Mn. Como já foi mencionado anteriormente, a absorção de iões Cd parece estar em competição para o mesmo transportador com o nutriente Mn, pelo que na presença de Cd a entrada de Mn pela raiz da planta é negativamente afetada.

Relativamente ao contaminante As, apenas a concentração de Mn para o dia 41 foi significativamente superior ao ensaio de controlo. Contudo, verifica-se um decréscimo acentuado

do mineral a partir do dia 55 comparativamente às amostras de controlo, afetando a sua absorção pelas plantas.

Analisando o ensaio com NaCl, verifica-se uma diminuição significativa do teor de Mn analogamente ao controlo para todos os tempos de colheita, à exceção do dia 48 que mostrou um teor de Mn semelhante ao obtido no ensaio de controlo. O decréscimo o teor de Mn, significa que na presença de NaCl a absorção do mineral pela planta é negativamente afetada.

4.3.8 Potássio

O gráfico da Figura 27 mostra o teor mineral nas plantas para o elemento Potássio.

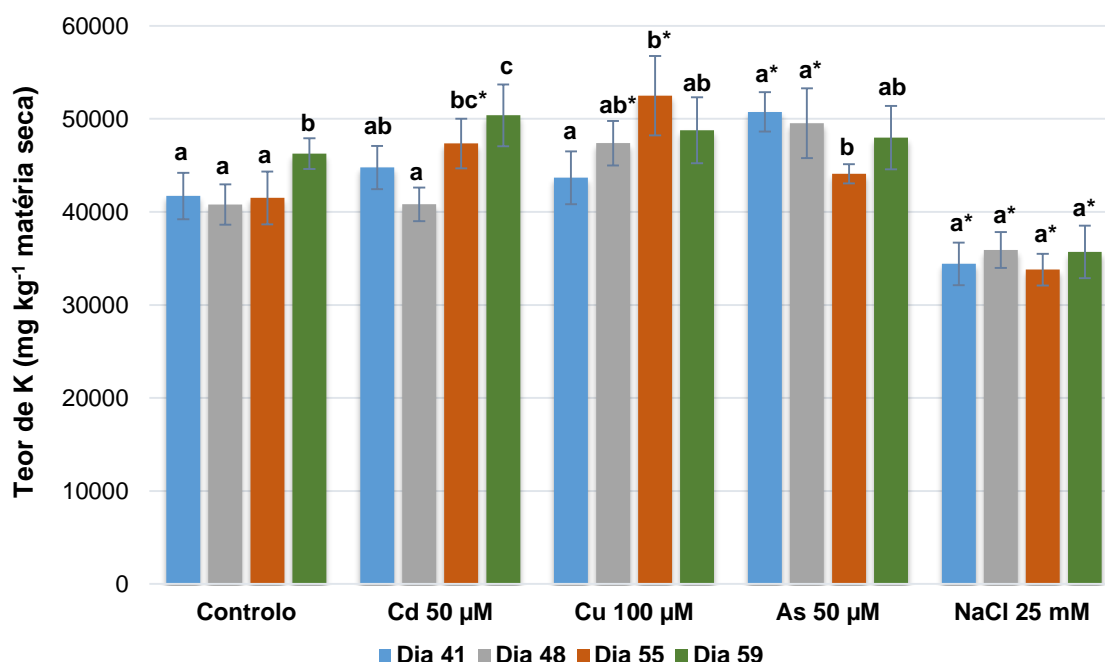


Figura 27 - Teor de K (mg kg^{-1} matéria seca) em folhas de plantas de rúcula, durante 39 dias de contaminação.

Legenda: As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre diversas concentrações PTE ou NaCl e o Controlo para um dado dia; $n=3$.

Como se pode observar na Figura 27, a adição de Cd, Cu e As na solução nutritiva influenciou significativamente o teor de K nas folhas comparativamente às amostras de controlo, tendo-se observado um aumento considerável nos teores de K nas plantas contaminadas com Cd no dia 55, Cu nos dias 48 e 55 e As nos dias 41 e 48.

Quanto às amostras contaminadas com NaCl, o teor de K foi significativamente inferior quando comparado com o ensaio de controlo a partir do dia 41. Este ensaio foi o único que apresentou menores valores nos teores de K, pelo que segundo Mengel & Kirky (2001) o excesso de Na^+ sobre K^+ pode resultar em deficiência de K^+ .

4.3.9 Sódio

O gráfico da Figura 28 mostra o teor mineral nas plantas para o elemento Sódio.

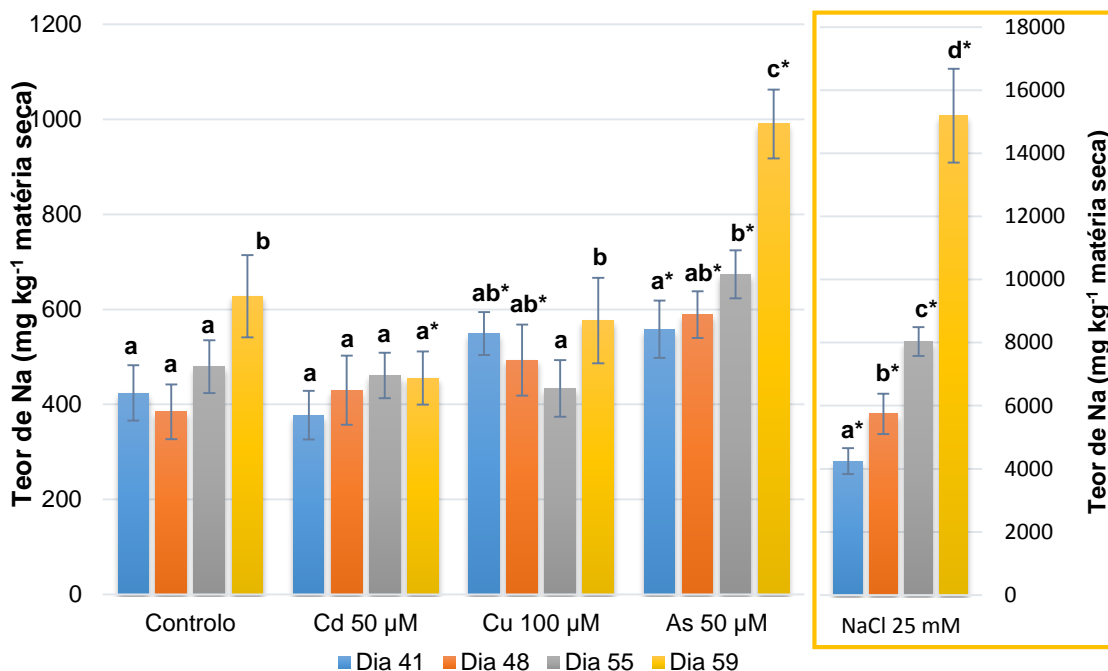


Figura 28 - Teor de Na (mg kg⁻¹ matéria seca) em folhas de plantas de rúcula, durante 39 dias de contaminação.

Legenda: As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre diversas concentrações PTE ou NaCl e o Controlo para um dado dia; $n=3$.

O teor de Na nas folhas, como se pode visualizar pelo gráfico (Figura 28), foi superior para as amostras contaminadas com NaCl ao longo de todo o período de exposição. Este acontecimento já era antecipado visto ter-se analisado o teor do mineral Na no ensaio com NaCl. Sendo assim, verificou-se um aumento significativo do teor de Na nas amostras contaminadas por NaCl, relativamente às observadas no ensaio com controlo.

Quanto aos restantes ensaios, este aumento significativo também foi visível para as amostras contaminadas com Cu nos dias 41 e 48 e As ao longo de todo o período de exposição. O aumento significativo do teor de Na para o contaminante As ao longo do tempo, pode estar relacionado com o facto de o As ter sido aplicado na solução nutritiva na forma de arsenato de sódio.

Para o ensaio com Cd, apenas o dia 59 apresentou uma concentração de Na significativamente inferior às amostras de controlo.

4.3.10 Zinco

O gráfico da Figura 29 mostra o teor mineral nas plantas para o elemento Zinco.

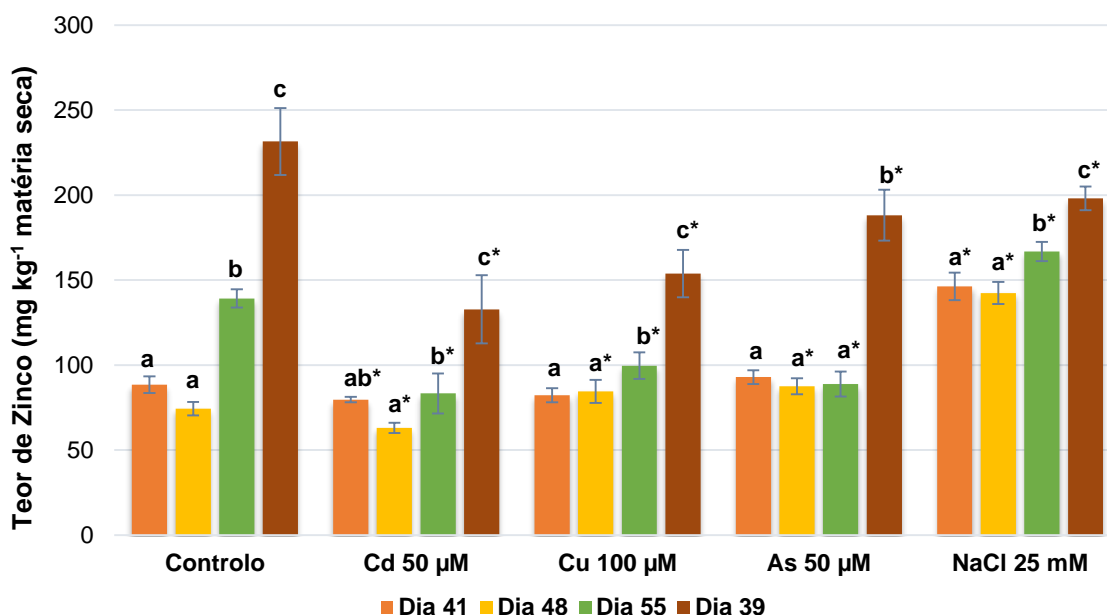


Figura 29 - Teor de Zn (mg kg^{-1} matéria seca) em folhas de plantas de rúcula, durante 39 dias de contaminação.

Legenda: As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre diversas concentrações PTE ou NaCl e o Controlo para um dado dia; $n=3$.

Analisando o gráfico da Figura 29 é possível observar que o ensaio com Cd foi o único que para todos os tempos de colheita reduziu significativamente o teor de zinco nas folhas face às amostras de controlo, para os mesmos tempos de colheita. Como o Cd e o Zn são quimicamente muito semelhantes, o Cd é capaz de comportar-se de maneira semelhante ao Zn nas suas funções de absorção e funções metabólicas (Mengel & Kirkby, 2001). Deste modo, as plantas que desenvolveram-se na presença de Cd contêm um teor reduzido de zinco.

Relativamente às amostras contaminadas com Cu e As, apenas o dia 48 apresentou um teor de Zn significativamente superior ao obtido pelas amostras de controlo. O mesmo já não acontece a partir do dia 55, ou seja, a partir deste período a concentração de Zn foi significativamente inferior às amostras de controlo, pelo que as contaminações de Cu e As, nos tempos referidos, tiveram uma influência negativa na absorção de Zn.

Quanto ao ensaio com NaCl, o teor de Zn mostrou-se claramente superior face às amostras de controlo a partir do dia 41, à exceção do dia 59 que conduziu a um decréscimo significativo do teor de Zn comparativamente ao ensaio de controlo. A aplicação de NaCl levou desta forma a um aumento do teor de Zn. Higbie *et al.* (2010) verificaram em genótipos de algodão, que a adição de NaCl (200 mM) levou a um aumento no teor de Zn.

5. CONCLUSÃO

Através da análise dos resultados obtidos pelos ensaios de crescimento, verificou-se que no geral a aplicação dos PTE e de NaCl não afetaram significativamente a biomassa das plantas ao longo do tempo, demonstrando um comportamento semelhante ao das amostras de controle. No entanto, o ensaio com NaCl foi o que apresentou menor quantidade de biomassa. Relativamente ao teor de matéria seca, na presença de PTE e NaCl observou-se uma tendência geral para o aumento deste parâmetro ao longo do ensaio. No teor de clorofila verificou-se uma diminuição considerável sobretudo nas amostras contaminadas com Cd e Cu, afetando o aparelho fotossintético que mostrou sintomas visíveis de cloroses.

Foi verificada a acumulação de PTE nas plantas de rúcula, obtendo-se valores de contaminação, após 41 dias, superiores aos limites estabelecidos por lei para produtos hortícolas de folha, sobretudo para o Cd (Ao fim de 41 dias: $9,4 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso fresco; Limite máximo para cádmio: $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso fresco) e As (Ao fim de 41 dias: $2,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso fresco; Limite máximo para arsenito de sódio: $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso fresco). Para as amostras contaminadas com Cd, os efeitos tóxicos foram visíveis ao fim de 55 dias de exposição, o que não se observou para as plantas contaminadas com As, que apresentaram durante todo o ensaio um aspeto saudável. A presença de As nas amostras vegetais poderá constituir um perigo para a saúde humana, pois durante todo o período de exposição ao contaminante as plantas apresentaram sempre uma aparência saudável. Os elevados teores de Cd e As comprovam a capacidade que a rúcula tem em absorver e transportar estes elementos para a parte aérea, podendo considerá-la como uma planta acumuladora de Cd e favorável à acumulação de As. Quanto ao Cu, a sua concentração também excedeu os limites por lei após 41 dias de exposição, mas apenas para as amostras contaminadas com Cu (Ao fim de 41 dias: $23,8 \text{ mg kg}^{-1}$ matéria seca; Limite máximo para cobre: 5 a 20 mg kg^{-1} de matéria seca).

Pela análise do teor mineral, o Cd absorvido aparenta estimular a absorção de Ca, Mg, Mn e K e a reduzir a absorção de Cu, Fe, Na e Zn. Para o ensaio com Cu, este elemento aparenta estimular a absorção de Ca, Mg, Mn e K e a reduzir a absorção de Fe, Na e Zn. No ensaio com As, verifica-se que este elemento aparenta estimular a absorção de Ca, Mg, K e Na e a reduzir a absorção de Cu, Fe, Mn e Zn. Relativamente ao ensaio com o contaminante NaCl, este aparenta estimular a absorção de Zn e Fe e a reduzir a absorção de Ca, Cu, Mg, Mn e K. Estes resultados confirmam que a presença de PTE e NaCl influenciam o valor nutritivo das plantas de rúcula.

Ao avaliar o comportamento global das plantas de rúcula, verificaram-se concentrações elevadas dos diferentes PTE testados e de NaCl, sendo os valores de contaminação para Cd e As, ao fim de 41 dias, superiores aos limites previstos por lei. No entanto, apenas as amostras contaminadas com As apresentaram um aspeto saudável (ausência de cloroses) ao longo de todo o ensaio, não havendo razões visíveis para serem rejeitadas pelo consumidor, o que poderá

constituir um perigo para a sua saúde. Por esta razão, torna-se da maior importância o controlo do local e condições de cultivo, de forma a evitar que os PTE entrem nas plantas e consequentemente na cadeia alimentar.

5.1 Propostas Futuras

Como propostas para trabalho futuro, seria interessante fazer a determinação do teor de clorofila por espectrofotometria (método destrutivo), de forma a poder correlacionar o valor obtido pelo método *Hansatech*, que resulta num número muito mais elevado de repetições, com o teor efetivo de clorofila medida no espectrofotómetro. Outras propostas seriam a determinação do teor mineral nas turfas com o objetivo de verificar o teor dos elementos que ali fica retido. Seria interessante também avaliar o nível de acumulação dos elementos estudados (Cd, Cu, As e NaCl) nos caules para comparar com os resultados obtidos nas folhas. Outras determinações experimentais que seriam interessantes, com vista a identificar as respostas da planta ao stresse induzido, seriam as seguintes:

- Peróxido de hidrogénio (identificação da presença de espécies reativas de oxigénio);
- Malondialdeído (MDA) (avaliação de danos causados nas membranas celulares);
- Atividades enzimáticas de enzimas envolvidas na resposta ao stresse oxidativo (como a superóxido dismutase, catalase, peroxidases, glutathione redutase, entre outras).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIANO, D.C. (1986). *Trace elements in the terrestrial environment*. Springer Verlag. New York, USA.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), (1999). *Toxicological Profile for cadmium*. Department of Health and Human Services, USA.
- AHMAD, P.; SARWAT, M.; SHARMA, S. (2008). *Reactive Oxygen Species, Antioxidants and Signaling in Plants*. Journal of Plant Biology **51** (3): 167-173.
- ALMEIDA, D. (2006). *Manual de Culturas Hortícolas – Volume I*. Presença (Ed.). Lisboa.
- ALMEIDA, J.; SANTOS, C. A. C.; SANTOS, A. R.; PEIXOTO, C. P.; SANTOS, J. M. S. (2011). *Avaliação do desenvolvimento da Rúcula em cultivo de hidropônico submetida a diferentes níveis de pH*. Centro Científico Conhecer. Enciclopédia Biosfera.
- APEL, K.; HIRT, H. (2004). *Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction*. Annu. Rev. Plant Biol. **55**: 373-399.
- BAPTISTA, P.; VENÂNCIO A. (2003). *Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos*. FORVISÃO – Consultoria em Formação Integrada, LDA. Guimarães.
- BENAVIDES, M. P.; GALLEGO, S. M.; TOMARO, M. L. (2005). *Cadmium toxicity in plants*. Plant Physiol **17** (1): 21-34.
- BOTHMANN, A. R. & SIMONETTI, A. P. M. (2011). *Uso de substratos na germinação de rúcula*. Cascavel, v.4, n.1, p.45-5. Brasil.
- CHEN, S.L.; KAO, C. H. (1995). *Glutathione reduces the inhibition of rice seedlings root growth caused by cadmium* Plant Growth regulation. **16**: 249-252.
- CLEMENS, S. (2006). *Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of ztolerance in plants*. Biochimie **88**: 1707–1719.
- CLEMENS, S.; PALMGREN, M.G.; KRÄMER, U. (2002). *A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation*. Trends in Plant Science **7**: 309-315.
- CUYPERS, A.; PLUSQUIN, M., REMANS, T.; JOZEFCZAK, M.; KEUNEN, E.; GIELEN, H.; OPDENAKKER, K.; NAIR, A. R.; MUNTERS, E.; ARTOIS, T. J., NAWROT, T.; VANGRONSVELD, J.; SMEETS, K. (2010). *Cadmium stress: an oxidative challenge*. Springer, **23**: 927-940.
- DI TOPPI, L. S.; GABBRIELLI, R. (1999). *Response to cadmium in higher plants*. Environmental and Experimental Botany **41**: 105–130.

- DIAS, N. S.; BLANCO, F. F. (2010). *Efeitos dos sais no solo e na planta*. Tecnologia em Salinidade. Fortaleza.
- DUFFUS, J. H. (2002). *Heavy Metal*. IUPAC. Pure Appl. Chem. **74** (5): 793-807.
- FERREIRA, I. C. F.R.; ABREU R. M. V. (2007). *Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos*. Artigo de Revisão. CIMO – Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança.
- FERREIRA, V. N. O. (2006). *Estudo do stress oxidativo induzido por arsénio em Lupinus albus L. na presença e ausência de fosforo*. Relatório de Trabalho de Fim de Curso em Engenharia Agronómica. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.
- GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. (2010). *Manejo da salinidade na agricultura: Estudo básicos e aplicados*. Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Salinidade. Fortaleza, Brasil.
- GOMES, C. (1998). *Estudo do efeito do Cádmio no Desenvolvimento de algumas espécies vegetais*. Relatório Fim de Curso de Engenharia Agronómica. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.
- GONÇALVES, I.M. (2000). *Fundo Geoquímico, Poluição e Comportamento do Antimónio, Cádmio, Chumbo, Crómio, Estanho e Zinco em Fluvissolos* - Relatório Final de Curso de Engenharia Agronómica. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.
- GRATÃO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. (2005). *Making the life of heavy metal stressed plants a little easier*. Funct Plant Biol **32**: 481-494.
- GUPTA, D. K.; SANDALIO, L. M. (2012). *Metal Toxicity in Plants: Perception, Singnaling and Remediation*. Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas Granada. Espanha.
- HAFSI C.; ROMERO-PUERTAS M. C.; DEL RÍO L. A.; SANDALIO L. M.; ABDELLY C. (2010). *Differential antioxidative response in barley leaves subjected to the interactive effects of salinity and potassium deprivation*. Springer Science+Business Media.
- HALLIWELL, B. (2006). *Reactive species and antioxidants*. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant Physiology **141**: 312-322.
- HARTLEY, W. & LEPP, N.W. (2008). *Remediation of arsenic contaminated soils by iron-oxide application, evaluated in terms of plant productivity, arsenic and phytotoxic metal uptake*. Science of the Total Environment **390**: 35-44.
- HIGBIE, S.M.; WANG, F.; STEWART, J. MCD.; STERLING, T.M.; LINDEMANN, W.C.; HUGHS, E.; ZHANG, J. (2010). *Physiological Response to Salt (NaCl) Stress in Selected Cultivated Tetraploid Cottons*. International Journal of Agronomy. 12 pp.

- KABATA-PENDIAS, A. & PENDIAS, H. (2001). *Trace elements in soils and plants*. CRC Press, Boca Raton. 3ª ed., USA.
- LAMAS, M. B. C. (2012). *Efeito da exposição e acumulação de elementos potencialmente tóxicos e salinidade em Alface*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.
- MARTINS, L.; MOURATO, M. (2008). *Alterações no metabolismo de plantas em meios contaminados por metais pesados: stresse oxidativo*. Revista Agros.
- MARTINS, L.; MOURATO, M. (2006). *Effect of Excess Copper on Tomato Plants: Growth Parameters, Enzyme Activities, Chlorophyll, and Mineral Content*. Journal of Plant Nutrition **29**: 2179-2198.
- MARTINS, L.L.; MOURATO, M.P.; CARDOSO, A.I.; PINTO, A.P.; MOTA, A.M.; GONÇALVES, M.L.S.; VARENNES, A. (2011). *Oxidative stress induced by cadmium in Nicotiana tabacum L.: effects on growth parameters, oxidative damage and antioxidant responses in different plant parts*. Acta Physiol Plant.
- MASCHER, R.; LIPPMANN, B.; HOLZINGER, S.; BERGMANN, H. (2002). *Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants*. Plant Science **163**: 961-969.
- MEHARG, A. A.; HARTLEY-WHITAKER, J. (2002). *Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species*. New Phytologist **154**: 29-43.
- MENDES, B.; OLIVEIRA, J.F.S. (2004). *Qualidade da água para consumo humano*. Lidel (Ed.). Lousã.
- MENGEL, K.; KIRBY, E. A. (2001). *Principles of plant nutrition*. 5ª Edição. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 593 p.
- MITHOFER, A.; SCHULZE, B.; BOLAND, W. (2004). *Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals*. FEBS Letters: 1–5 Publishers. Dordrecht.
- MITTLER, R. (2002). *Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Review*. Plant Science. Elsevier.
- MOLLER, I. M.; JENSEN, P.E.; HANSSON, A. (2007). *Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants*. Review. Plant Biological.
- MOREIRA, I. N. (2011). *Mecanismos antioxidantes de resposta ao stresse induzido por metais tóxicos em nabças*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.

- MOURATO, M.; REIS, R.; MARTINS, L. L. (2012). *Characterization of Plant Antioxidative System in Response to Abiotic Stresses: A Focus on Heavy Metal Toxicity*. Capítulo 2 em *Advances in Selected Plant Physiology Aspects*. 388 páginas. Ed. Giuseppe Montanaro and Bartolomeo Dichio, InTech, 388 pp.
- NAVROT, N.; ROUHIER, N.; GELHAYE, E.; JACQUOT, J. P. (2007). *Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria*. *Physiologia Plantarum* **129**: 185-195.
- OLIVEIRA, A. B.; GOMES-FILHO, E.; ENÉAS-FILHO, J. (2010). *O problema da salinidade na agricultura e as adaptações das plantas ao estresse salino*. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.6, N.11. Brasil.
- PINTO, F. R. (2011). *Avaliação da Resposta ao Stresse Oxidativo Induzido por Cádmio em Plantas de Espinafre (Spinacea oleracea L.)*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.
- PINTO, A.P.; ALVES, A.S.; CANDEIAS, A.J.; CARDOSO, A.I.; VARENNES, A.; MARTINS, L.L.; MOURATO, M.P.; GONÇALVES, M.L.S.; MOTA, A.M. (2009). *Cadmium accumulation and antioxidative defences in Brassica juncea L. Czern, Nicotiana tabacum L. and Solanum nigrum L.* Taylor & Francis. International Journal Environmental Anal. Chemistry.
- PRASAD, M. N. V. (2004). *Heavy Metal Stress in Plants - From Biomolecules to Ecosystems*. 2nd Edition. Springer
- REGULAMENTO (CE) N.º 396/2005 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 23 de Fevereiro de 2005.
- REGULAMENTO (CE) N.º 466/2001 da Comissão de 8 de Março de 2001.
- REICHMAN, S. M. (2002). *The Responses of Plants to Metal Toxicity: A review focusing on Copper, Manganese and Zinc*. Australian Minerals & Energy Environment Foundation.
- REZANKA, T.; SIGLER, K., (2008). *Biologically active compounds of semi-metals*. *Phytochemistry*. 69: 585-606.
- RODRIGUES, G. S. O.; TORRES, S. B.; LINHARES, P. C. F.; FREITAS, R. S. & MARACAJÁ, P. B. (2008). *Quantidade de esterco bovino no desempenho agrônomo da rúcula (Eruca sativa L.)*. Cultivar cultivada. Revista Caatinga, vol. 21, núm. 1, enero-marzo, pp. 162-168. Brasil.
- ROSSI, V. S. (2012). *Mecanismo antioxidante em plantas*. Qualificação e Expansão da Educação Superior no Contexto do Plano Nacional de Educação. UNIMEP.
- SCANDALIOS, J. G. (2002). *The Rise of ROS*. Elsevier.

- SCANDALIOS, J. G. (1993). *Oxygen Stress and Superoxide Dismutases*. Update on Abiotic Stress. Department of Genetics, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, EUA.
- SCANDALIOS, J. L. (2005). *Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 38: 995-1014.
- SHARMA, S.; DIETZ, K. (2008). *The relationship between metal toxicity and celular redox imbalance*. Trends in Plant Science **14** (1): 43-50.
- SILVA, H. (2006). *Determinação do teor de metais pesados em produtos vegetais frescos – Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Eng. Alimentar*. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.
- SINGH, N.; MA, L.Q. (2006). *Arsenic speciation, and arsenic and phosphate distribution in arsenic hyperaccumulator Pteris vittata L. and non-hyperaccumulator Pteris ensiformis L.* Environmental Pollution. Elsevier. **141** (2): 238-246.
- SMEETS, K.; RUYTINX, J.; VAN BELLEGHEM, F.; SEMANE, B.; LIN, D.; VANGRONSVELD, J.; CUYPERS, A. (2007). *Critical evaluation and statistical validation of a hydroponic culture system for Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. Biochem. **46**: 212-218.
- SMOLDERS, E.; MERTENS, J. (2013). *Cadmium*. Heavy Metals in Soils. Springer. Ed. B. J. Alloway, 3rd Ed.
- SOARES, A. M. S. S.; MACHADO, O. L. T. (2007). *Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigénio*. Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas. **1** (1): 9-17.
- STEINER, F.; JUNIOR, A. S. P.; DRANSKI, J. A. L.; ZOZ T. & RHEINHEIMER A. R. (2010). *Germinação de sementes de rúcula sob diferentes temperaturas*. Scientia Agraria, Curitiba, v.11, n.2, p.119-124.
- VANGRONSVELD, J., AND H. CLIJSTERS (1994). *Toxic effects of metals. In Plants and the chemical elements. Biochemistry, uptake, tolerance and toxicity*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft.
- VARENNE, A. (2003). *Produtividade dos Solos e Ambiente*. Escolar Editora. Lisboa. 490 p.
- VASCONCELOS, R. L.; FREITAS, M. P. N.; BRUNINI, M. A. (2011). *Características físico-químicas da rúcula cv. cultivada produzida no sistema convencional e no Baby Leaf*. Nucleus, v.8, n.2. Brasil.
- VEIGA, A.; LOPES, A.; CARRILHO, E.; SILVA, L.; DIAS, M. B.; SEABRA, M. J.; BORGES, M.; FERNANDES, P.; NUNES, S. (2009). *Perfil de risco dos principais alimentos consumidos em*

Portugal. *Autoridade de Segurança Alimentar e Económica*. Direção de Avaliação e Comunicação dos Riscos.





















WÓJCIK, M.; PAWLIKOWSKA-PAWL GA, B. & TUKIENDORF, A. (2009). *Physiological and Ultrastructural Changes in Arabidopsis thaliana as Affected by Changed GSH Level and Cu Excess*. Russian Journal of Plant Physiology. Rússia.

YRUELA, I. (2009). *Copper in plants: acquisition, transport and interactions*. Functional Plant Biology **36**: 409-430.












Webgrafia:

- <<http://www.agroportal.pt/a/2002/fipa.htm>> acesso em: Outubro de 2013.
- <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945202002455>> acesso em: Outubro de 2013.
- <http://www.floraiberica.es/floraiberica/texto/pdfs/04_072_60_Eruca.pdf> acesso em: Outubro de 2013.

ANEXO I - Ensaio de Crescimento nos dias de colheitas

	Controlo	Cádmio	Cobre	Arsénio	Salinidade
Dia 41					
Dia 48					
Dia 55					
Dia 59					

ANEXO II – Ensaio de Crescimento ao longo do tempo de exposição

	Dia 35	Dia 45	Dia 52	Dia 59
Controlo				
Cádmio				
Cobre				

		Dia 35	Dia 45	Dia 52	Dia 59
Arsénio	Salinidade	